

Institut für Molekularbiologie
(Tumorforschung)



**Identifizierung und Charakterisierung von KIAA0767/Dip
als neuer E2F1-induzierter Faktor mit
pro-apoptotischer Funktion**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Jens Stanelle
aus Oberhausen

Dezember 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. B. Pützer

2. Gutachter: PD Dr. J. Thomale

3. Gutachter: --

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. H. Grunz

Tag der mündlichen Prüfung: 29.3.04

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungen	v
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der Zellzyklus.....	1
1.2 pRb und 'pocket' Proteine	2
1.3 Die E2F Familie	3
1.4 E2F-Regulation	7
1.5 Die Rolle von E2Fs für Proliferation, Differenzierung und Karzinogenese	8
1.6 E2F1-vermittelte Apoptose	9
1.7 Signalwege E2F1-induzierter Apoptose	12
1.8 Zielsetzung der Arbeit	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien, Puffer, Enzyme	17
2.1.2 Kits	17
2.1.3 Plasmidvektoren	18
2.1.4 Adenoviren	19
2.1.5 Antikörper	20
2.1.6 Oligonukleotide	21
2.1.7 Zelllinien	23
2.1.8 Bakterienstämme	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Zellkultur und Transfektionen	25
2.2.1.1 Kultivierung von Zellen	25
2.2.1.2 Zellzahlbestimmung	25
2.2.1.3 Calciumphosphattransfektion	25
2.2.1.4 Elektroporation	25
2.2.1.5 Sonstige Transfektionsmethoden	26
2.2.2 DNA-Arbeitstechniken	26
2.2.2.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> Bakterien (Mini-Präparation)	26
2.2.2.2 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> Bakterien (Maxi-Präparation)	27
2.2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung	28
2.2.2.4 Elektrophoretische Trennung von DNA	28
2.2.2.5 Elution von DNA aus Agarosegelen	28
2.2.2.6 DNA-Transformation durch Hitzeschock	28

2.2.2.7	DNA-Transformation durch Elektroporation.....	29
2.2.2.8	Restriktion von DNA.....	29
2.2.2.9	Auffüllen und Verdau von 5' bzw. 3'-überhängenden Enden.....	29
2.2.2.10	DNA-Dephosphorylierung.....	29
2.2.2.11	Ligation von DNA.....	30
2.2.2.12	DNA-Amplifikation.....	30
2.2.2.13	Zielgerichtete DNA-Mutagenese.....	31
2.2.3	RNA-Arbeitstechniken.....	31
2.2.3.1	RNA-Präparation.....	31
2.2.3.2	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	31
2.2.3.3	Reverse Transkription.....	31
2.2.4	Protein-Arbeitstechniken.....	32
2.2.4.1	Gesamtzellextrakt-Generierung.....	32
2.2.4.2	Protein-Konzentrationsbestimmungen.....	32
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	32
2.2.4.4	Western Blotting.....	32
2.2.4.5	Immundetektion.....	33
2.2.4.6	<i>in vitro</i> Translation.....	33
2.2.5	Mikroarraytechnologie.....	33
2.2.5.1	Herstellung von DNA-Hybridisierungssonden.....	33
2.2.5.2	Hybridisierung.....	33
2.2.5.3	Detektion und Auswertung.....	34
2.2.6	Adenovirale Arbeitstechniken.....	34
2.2.6.1	AdEasy-Technologie.....	34
2.2.6.2	Klonierung und Generierung adenoviraler Vektoren.....	34
2.2.6.3	Titration adenoviraler Vektoren.....	35
2.2.6.4	Adenovirale Infektion von Zellen.....	35
2.2.7	Zytotoxizitäts- und Apoptoseanalyseverfahren.....	36
2.2.7.1	MTT-Assay.....	36
2.2.7.2	Durchflusszytometrische DNA-Gehaltsbestimmung.....	36
2.2.7.3	Kernfärbung apoptotischer Zellen.....	36
2.2.7.4	Detektion von nukleosomalen DNA-Fragmenten.....	37
2.2.8	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	37
2.2.9	Reportergenanalyse.....	38
2.2.10	si-RNA-Technologie.....	38
2.2.11	Zellkompartimentfraktionierung.....	38
2.2.12	Colony Assay.....	39

3	ERGEBNISSE	40
3.1	E2F1 reguliert Gene verschiedenster zellulärer Funktion	40
3.1.1	Herstellung und Charakterisierung von E2F1-regulierbaren Zelllinien	40
3.1.2	Mikroarray Analyse zur Identifizierung neuer E2F1-regulierter Faktoren	45
3.1.3	Verifizierung der Mikroarray-Daten	46
3.2	Neue E2F1-regulierte Faktoren mit pro-apoptotischer Funktion	50
3.2.1	Vollängenklonierung von KIAA0455, KIAA0717 und KIAA0767	51
3.2.2	KIAAs beeinflussen die Zellvitalität in verschiedenen Zellsystemen	52
3.2.3	KIAA0767-Expression führt zu erhöhter sub-G1 Population, KIAA0717 ruft einen G2/M-Arrest hervor	55
3.2.4	KIAA0767 induziert morphologische Veränderungen und DNA-Fragmentierung	56
3.2.5	KIAA0767 induziert typische Todessignaltransduktionskaskaden	59
3.3	KIAA0767 alias 'death inducing protein' (Dip)	60
3.3.1	Dip co-lokalisiert in den Mitochondrien	61
3.3.2	Dip Protein-Expression wird durch E2F1-Aktivierung induziert	63
3.3.3	Dip ist an E2F1-induzierter Apoptose beteiligt	65
3.3.4	Dip-Promotorkonstrukte sind nicht durch E2F1 aktivierbar	67
3.3.5	Dip ist durch p73 β , aber nicht durch p73 α oder p53 induzierbar	69
3.3.6	E2F1 induziert Cytochrom c und die Dip-Freisetzung aus den Mitochondrien	69
4	DISKUSSION	71
4.1	E2F1 reguliert eine Vielzahl von Genen	71
4.2	Untersuchungen neuer E2F1-regulierter Gene auf pro-apoptotische Funktionen	74
4.3	KIAA0767/Dip: ein effektiver Mediator E2F1-induzierter Apoptose	76
4.4	Ausblick	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	LITERATUR	84
	ANHANG	98
	DANKSAGUNGEN	104
	PUBLIKATIONSLISTE	105

LEBENS LAUF	106
ERKLÄRUNGEN	107

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
Apaf-1	apoptosis protease-activating factor 1
ARF	Alternativer Leserahmen (=alternate reading frame)
ATP	Adenosin-5' Triphosphat
Bad	Bcl2 antagonist of cell death
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-x_L	B-cell CLL/lymphoma x _L
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (=bovine serum albumine)
Cdc	Cell division cycle protein
Cdk	Cyclin-abhängige Kinasen (=Cyclin dependent kinase)
cDNA	mRNA komplementärer Strang (=complementary DNA)
Ci	Curie (Aktivität radioaktiver Substanz; 1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ s ⁻¹)
Cki	Cdk Inhibitor
CMV	Cytomegalievirus
CPE	zytopathischer Effekt
cpm	counts per minute (radioaktive Impulse min ⁻¹)
Cyc	Cycline
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (=desoxyribonucleic acid)
DNA pol α	DNA Polymerase alpha
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
ds	doppelsträngig
et al.	et alii
ECL	enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EST	Expressed sequence tag
FACS	Durchflusszytometer (=fluorescence activated cell sorter)
FCS	fetales Kälberserum (=fetal calf serum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HRP	Meerrettich Peroxidase (=horseradish peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IGF-BP 3	insulin growth factor binding protein 3
kB	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
Luc	Luciferase
moi	Infektionsmultiplizität (=multiplicity of infection)
mRNA	messenger RNA
MTT	Mitochondrialer Toxizitätstest
OD	Optische Dichte

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-Ribose) Polymerase
PBS⁼	phosphate buffered saline ohne Magnesium und Calcium
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
Pfu	Plaque bildende Einheiten (=plaque forming units)
pH	potentia hydrogenii
PI	Propidium-Iodid
RFC	Replikationsfaktor C
RNA	Ribonukleinsäure (=ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (=rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit reverser Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian virus 40
TCID₅₀	infektiöse Dosis in Zellkultur
T_M	Schmelztemperatur
U	Units (Enzymaktivität; 1U = 1 mol x min ⁻¹)
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
wt	Wildtyp

1 EINLEITUNG

Das Überleben einer Zelle ist das Ergebnis einer fein abgestimmten Homöostase zwischen Zellwachstum und Zelltod. Die Balance zwischen diesen beiden Prozessen ist im Laufe der Entwicklung eines Organismus von entscheidender Bedeutung. Die Verschiebung des Gleichgewichtes hin zu verstärktem Zellwachstum, der Proliferation, ist ein fundamentaler Schritt bei der Tumorentstehung.

Tumorzellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie eine reduzierte Sensitivität auf anti-proliferative Signale wie anti-Wachstumsfaktoren aufweisen (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Einleitung des programmierten Zelltodes, der Apoptose, stellt eine wichtige zelluläre Schutzfunktion zur Verminderung der Tumorentstehungen dar. Dieser Mechanismus ist häufig durch Mutationen von Tumorsuppressorgenen außer Kraft gesetzt (Hartwell und Kastan, 1994).

Die Identifizierung apoptoserelevanter Gene und die Untersuchung der zugrunde liegenden Netzwerke sind essentiell für das Verständnis der molekularen Zusammenhänge und daraus resultierende therapeutische Strategien.

1.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus in Säugerzellen ist in vier Phasen unterteilt, die G1-, S-, G2- und M-Phase. Die Zellteilungsphase oder Mitose (M-Phase) und die Replikations- und DNA-Synthese Phase (S-Phase) werden durch die Wachstumsphasen G1 und G2 getrennt. Bevor Zellen in die S-Phase eintreten, passieren sie in der späten G1-Phase den sog. Restriktionspunkt. Nach Überschreiten des Restriktionspunktes treten Zellen ohne Umkehrmöglichkeit in die S-Phase ein und komplettieren den Zellzyklus unabhängig von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren (Sherr, 1996). Die Koordination für das Durchschreiten des Restriktionspunktes wird durch die aufeinanderfolgende Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) in der G1-Phase gesteuert. Die Aktivität der Cdks wird dabei durch die Bindung von Cyclinen an die regulatorische Cdk-Untereinheiten, durch Cdk-Inhibitoren (Cdis) und durch deren Phosphorylierungsstatus gesteuert (Sherr, 1996). Mitogene Wachstumsfaktoren aktivieren D Cycline (Mitnacht, 1998), die Komplexe mit Cdk4 oder Cdk6 eingehen können und durch Phosphorylierung von Schlüsselproteinen des Zellzyklus wie dem Retinoblastoma (pRb) Tumorsuppressorprotein das Durchschreiten des Restriktionspunktes zur Folge haben. Die Hyperphosphorylierung von pRb (pRb-Inaktivierung) führt zur Freisetzung des E2F bindenden Faktors (E2F), was zur Aktivierung von Zielgenen inklusive Cyclin E (Ohtani et al., 1995; Botz et al., 1996) führt, die wiederum mit Cdk2 Komplexe bilden und innerhalb eines 'Feedback'-Mechanismus die weitere E2F-Freisetzung durch pRb Phosphorylierung induzieren (Lundberg und Weinberg, 1998). Der massive Anstieg von Cyclin E/Cdk2-Komplexen ist Voraussetzung für die Initiation der DNA-Replikation (Sherr, 1996).

Zwei Arten von Cdi Familien (Sherr und Roberts, 1999) regulieren die Cdk-Aktivität. Hierbei inhibieren Ink4a-Proteine, von denen bisher vier beschrieben wurden ($p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ und $p19^{INK4d}$) spezifisch Cdk4 und 6. Die zweite Cdi-Familie der Cip/Kip Inhibitoren greift sowohl die Cycline als auch die Cdk-Untereinheit von Cyclin A-, Cyclin D- und Cyclin E-abhängigen Kinasen an (Sherr und Roberts, 1999). Zu dieser Familie zählen $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ und $p57^{Kip2}$. Das regulatorische Potential dieser Inhibitoren ist enorm, da sie unter zellulären Streßbedingungen wie z.B. DNA-Schädigung das Fortschreiten des Zellzyklus verhindern und pRb in hypophosphoryliertem (aktivem) Zustand halten. Hier spielt das pRb Tumorsuppressorprotein bei der Regulation von Proliferation und dem Überleben einer Zelle eine entscheidende Rolle (Dyson, 1998). Die Wirksamkeit dieses Signalweges wird dabei durch die Aktivität des Effektors E2F vermittelt (Nevins, 1998) (Abb.1.1).

1.2 pRb und 'pocket' Proteine

Das *Rb* Gen besitzt alle Eigenschaften eines klassischen Tumorsuppressorgens und ist in mindestens einem Drittel aller Tumoren mutiert oder komplett abwesend (Weinberg, 1995; Sherr, 1996). Mutationen in einzelnen Allelen im *Rb* Gen erzeugen eine Prädisposition für eine große Anzahl von Tumorarten (Weinberg, 1995); hereditäre inaktivierende Mutationen im *Rb* Gen dagegen sind mit dem selten auftretenden Retinoblastoma Tumor der Augen im Kindesalter assoziiert (Friend et al., 1986).

pRb ist zusammen mit p107 und p130 Mitglied der 'pocket' Proteinfamilie (Wang, 1997; Dyson, 1998). Alle 'pocket' Proteinfamilienmitglieder besitzen eine überlappende Sequenzhomologie, vor allem in der 'pocket' Domäne der jeweiligen Proteine. Trotz der bestehenden Homologie ist *Rb* das einzige Gen, das in Tumorzellen häufig mutiert ist (Weinberg, 1995). Die physiologische Bedeutung jedes einzelnen Familienmitgliedes wurde durch 'knockout' Mausmodelle aufgeklärt. *Rb*^{-/-} Mäuse sind nicht lebensfähig und zeigen eine Lethalität zwischen den embryonalen Tagen E13 und E15 und weisen Differenzierungsanomalien in einer Vielzahl von Geweben auf, die wahrscheinlich durch unkoordinierten Zellzykluseintritt und Apoptoseinduktion hervorgerufen werden (Clarke et al, 1992). *p107*^{-/-} und *p130*^{-/-} Mäuse dagegen sind lebensfähig und zeigen keine Tumorbildung, was die unterschiedliche Bedeutung von p107 und p130 in bezug auf die Zellzykluskontrolle im Gegensatz zu pRb unterstreicht. Jedoch zeigen *p107*^{-/-} und *p130*^{-/-} Doppel-'knockout'-Mäuse embryonale Lethalität, was für eine funktionelle Überlappung zwischen p107 und p130 spricht (Cobrinik et al., 1996). Es konnte jedoch beobachtet werden, daß in Abwesenheit von p107 in *Rb*^{+/-} Embryos die Entwicklung von Abnormalitäten beschleunigt wird, was ebenfalls für eine funktionelle Redundanz zwischen pRb und p107 spricht (Lee et al., 1996). Daher ist es eher unwahrscheinlich, daß p107 und p130 eine Tumorsuppressorfunktion innehaben, auch gerade deshalb, weil die Mutation dieser beiden Gene in Tumoren bislang nicht beschrieben wurde.

Die E2F-pRb-Bindung findet über das E2F-Peptidsequenzmotiv LXCXE mit der *'pocket'* Region statt (Wang, 1997). Virale Onkoproteine wie SV 40 *'large T antigen'*, HPV E7 und Ad E1A besitzen ebenfalls das gleiche Sequenzmotiv und können so mit pRb interagieren (Mulligan und Jacks, 1998). Die Fähigkeit viraler Proteine, Zellen zu transformieren, beruht darauf, über die pRb-Bindung die normale Wachstumskontrolle auszuschalten. Die Rolle von E2F wurde deutlich, als beschrieben wurde, daß E2F für die Funktion von pRB bedeutsam ist (Bandara und La Thangue, 1991; Nevins, 1992).

1.3 Die E2F Familie

E2F wurde als erstes zelluläres Protein identifiziert, das den Tumorsuppressor pRb binden kann (Bagchi et al., 1991; Bandara und La Thangue, 1991; Chittenden et al., 1991; Helin, et al., 1992; Kaelin et al., 1992). pRb reguliert über E2F die Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose durch Inhibierung von E2F-regulierten Promotoren. Die zelluläre Aktivität von E2F beruht auf einem heterodimeren Komplex aus einem der bis vor kurzem sechs Mitglieder zählenden E2F-Familie (E2F1 bis E2F6) in Verbindung mit je einem der zwei DRFT1-Polypeptid-1 (DP) Familienmitglieder (Dyson, 1998). Das kürzlich identifizierte murine E2F7 besitzt keine DP-Dimerisierungsdomäne, so daß dessen Aktivität unabhängig von DP Partnern ist (DeBruin et al., 2003). Heterodimere Komplexe aus E2Fs und DPs können *in vitro* in allen denkbaren Kombinationen auftreten und werden durch alternative Spleißprodukte von DP2 und E2F3 in ihrer Anzahl noch komplexer (De la Luna et al., 1996; Adams et al., 2000). Die Komposition des Heterodimerkomplexes scheint über die DNA-Bindungsspezifität zu entscheiden (Tao et al., 1997). Die E2F-Familienmitglieder wurden bisher abhängig von ihrer *'pocket'* Proteinbindungsaffinität und ihren funktionell überlappenden Eigenschaften in drei Gruppen unterteilt. E2F1 bis E2F3 bilden die erste Untergruppe und haben jeweils eine aminoterminal Cdk/Cyclin A-Bindungsdomäne und ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS). Dieser Bereich ist bei E2F4 und E2F5, den Mitgliedern der zweiten Gruppe, verkürzt. Statt dessen besitzen sie ein nukleäres Ausschleusungssignal (Gaubatz et al., 2001). E2F6, das die dritte Gruppe der E2F-Familienmitglieder darstellt, fehlen alle diese Domänen. E2F1, E2F2 und E2F3 binden exklusiv pRb und fungieren als Transaktivatoren. E2F4 und E2F5 hingegen zeigen vorzugsweise Affinität für p107 und p130 und fungieren transreprimierend auf E2F-regulierte Gene (Trimarchi und Lees, 2002). E2F6 interagiert mit keinem *'pocket'* Protein und übt Repressorfunktionen auf die E2F-abhängige Transkription mit *'chromatin modifiern'* aus (Trimarchi et al., 2001; Ogawa et al. 2002). E2F6 besitzt im Vergleich zu den vorherigen fünf E2F-Familienproteinen keine Transaktivierungsdomäne und unterscheidet sich deutlich von ihnen; es hat abgesehen von der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne wenig homologe Bereiche und ist carboxy- und aminoterminal trunkiert. Da über das neue E2F7 erst eine Studie existiert, und obwohl es wahrscheinlich zusammen mit E2F6 aufgrund der

fehlenden Transaktivierungs- und 'pocket' Protein-Bindungsdomäne in die dritte Gruppe gehört, konnte es aufgrund der geringen Datenmenge noch nicht gesichert einer Untergruppe zugeordnet werden (Tabelle 1.1 und Abb. 1.2).

Protein	Zeitpunkt der Expression	'pocket' Protein - bindung	Phase des Zellzyklus im Komplex mit 'pocket' Protein	Nukleäres Lokalisationssignal	Cyclin A/Cdk2-Bindungsdomäne
E2F1	G1/S-Phase	pRb	G0, S, G1	+	+
E2F2	G1/S-Phase	pRb	G0, S, G1	+	+
E2F3	G1/S-Phase	pRb	G0, S, G1	+	+
E2F4	konstitutiv	p107 & p130	S, G0	-	-
E2F5	konstitutiv	p107 & p130	S, G0	-	-
E2F6	konstitutiv	-	-	+	-
E2F7	konstitutiv *, in S-Phase erhöht	-	-	+	-
DP1	konstitutiv	pRb, p107 & p130	G0, S, G1	-	-
DP2	konstitutiv	pRb, p107 & p130	G0, S, G1	Abhängig vom Spleißprodukt	-

Tabelle 1.1 Eigenschaften von E2F- und DP-Proteinen. Modifiziert nach Stevens und La Thangue, 2003. *, E2F7 wurde bisher nur auf mRNA Ebene und nicht als Protein analysiert.

Wenn E2Fs im Komplex mit hypophosphoryliertem pRb vorliegen, fungieren sie als transkriptionelle Repressoren. Freies E2F hingegen aktiviert die Transkription (Dyson, 1998; Müller und Helin, 2000) (Abb.1.1). Zu den durch E2F aktivierbaren Zielgenen gehören Zellzyklusregulatoren wie Cyclin E, Cyclin A, Cdc2, p107, pRB, c-Myc, N-Myc, B-Myb, E2F1 und E2F2, sowie Enzyme der DNA-Synthese wie die Dihydrofolatreduktase, DNA-Polymerase alpha und Thymidinkinase, aber auch essentielle Proteine für die DNA-Replikation wie ORC1, Cdc6 und das 'minichromosome maintenance' Protein MCM (Slansky und Farnham, 1996; Dyson, 1998). Pro-apoptotische E2F-Zielgene sind der 'apoptosis protease-activating factor 1' (Apaf-1), p73 und p19^{ARF} (Bates et al., 1998; Irwin et al., 2000; Stiewe und Pützer, 2000; Moroni et al., 2001).

Die Mitglieder der ersten E2F Untergruppe, E2F1 bis E2F3, aktivieren E2F-responsive Gene und treiben die Zellproliferation voran (DeGregori et al., 1997). Die Überexpression jedes dieser Transkriptionsfaktoren aktiviert ruhende Zellen zum Eintritt in den Zellzyklus (Johnson et al., 1993; Asano et al., 1996; Lukas et al., 1996; Wang et al., 1998). Dieser Wiedereintritt in die S-Phase kann sowohl durch spezifische dominant-negativ wirkende Proteinmutanten (Wu et al., 1996), wie auch durch die Entfernung von E2F1 bis E2F3 (Wu et al., 2001) verhindert werden. Neben dem Wiedereintritt in den Zellzyklus kann die Überexpression von E2F1, E2F2 und E2F3 wachstumsinhibitorische Effekte von p16 (Lukas et al., 1996) und TGFβ ('tumor growth factor β') (Schwarz et al., 1995) oder eine durch Bestrahlung (DeGregori et al., 1995) hervorgerufene Zellzyklusarretierung aufheben. Der S-Phasen-Eintritt wird durch die Dimerisierungs-, DNA-Bindungs- und Transaktivierungsdomänen der Transkriptionsfaktoren vermittelt (Johnson et al., 1993; Qin et al., 1994), was für die Beteiligung von E2F-regulierten Zielgenen an diesem Prozeß spricht. Die Aktivität von E2F wird wiederum durch die pRb-Bindung kontrolliert und zwar

so, daß das 'pocket' Protein die Transaktivierungsdomäne abschirmt und dadurch den Kontakt des E2F/DP-Heterodimers zu anderen für die Transkription benötigten Proteinen verhindert. In *in vitro* Transkriptions- und DNase 'footprinting'-Studien konnte gezeigt werden, daß pRb den Aufbau des Transkriptionsinitiationskomplexes verhindert (Ross et al., 1999).

Einen Mechanismus für die Langzeit-Repression von zellzyklusregulierten Genen übt pRb durch Rekrutierung von chromatin-modifizierenden Proteinen wie der Histon-Deacetylase (HDAC), der Histon-Methyltransferase (MTase) SUV39H1 oder der humanen Analoga zu Hefe SWI2/SNF2-Proteinen aus (Brehm et al., 1998; Harbour und Dean, 2000; Zhang et al., 2000; Nielsen et al., 2001).

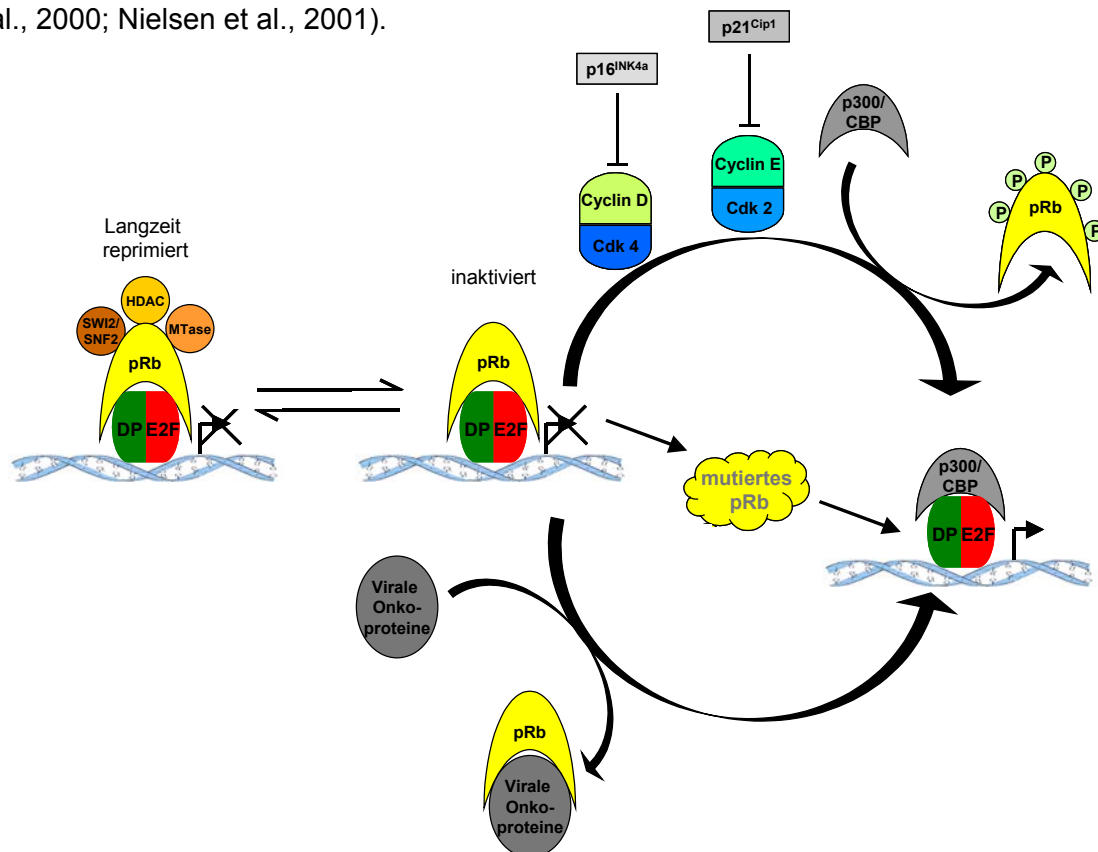


Abb. 1.1 Regulation von E2F. Durch pRb inaktiviertes E2F/DP wird durch Cdk's nach pRb Phosphorylierung aktiviert und transaktiviert mit anderen Cofaktoren wie p300/CBP Zielgene. pRb kann durch virale Onkoproteine inaktiviert werden und zur Freisetzung von E2F/DP-Heterodimeren führen. Mutiertes pRb in Tumoren kann E2F/DP-Komplexe nicht binden. Langzeit Repression tritt ein, wenn pRb weitere Proteine wie HDAC, MTasen und SWI2/SNF2 rekrutiert, die die Chromatin Umgebung so verändern, daß ein für die Transkriptionsinitiation inaktiver Zustand geschaffen wird.

Damit wird ein für die Transkriptionsinitiation inaktiver Zustand geschaffen, und zellzyklusregulierte Gene können so über einen langen Zeitraum reprimiert werden (Abb. 1.1).

Während die Expression von E2F1-, E2F2- und E2F3-Proteinen vor allem während des Überschreitens der G1/S-Zellzyklusphasengrenze auftritt, werden E2F4 und E2F5 durch alle Zellzyklusphasen und auch in der ruhenden G0-Phase permanent konstitutiv exprimiert (Dyson, 1998). Die Mitglieder der zweiten E2F Untergruppe heben sich nicht nur durch ihre Sequenzunterschiede, sondern auch durch ihre Repressorfunktion bezüglich E2F-responsiver Gene von E2F1 bis E2F3 ab. Diese reprimierende Wirkung hat

in der unterschiedlichen zellulären Lokalisation ihren Ursprung. E2F4 und E2F5 sind cytoplasmatisch lokalisiert und sind hinsichtlich ihrer Translokation in den Zellkern von der Bindung an '*pocket*' Proteine (Allen et al., 1997; Verona et al., 1997) oder an DP2 (Magae et al., 1996) abhängig.

E2F4- und E2F5-Komplexe mit '*pocket*' Proteinen werden hauptsächlich während der G0/G1-Phase gefunden. Außerdem führen Mutationen der E2F-Bindungsstellen in den Promotorregionen von E2F-regulierten Genen wie B-Myb oder Cdc2 zu erhöhter Expression dieser Gene in der G0/G1-Phase, was für eine Repression durch E2F4 und E2F5 spricht (Dalton, 1992; Lam und Watson, 1993). E2F-Promotor-Bindungsstellen werden durch eine große Anzahl von E2F4/p130-Komplexen während der G0/G1-Phase *in vivo* besetzt, dagegen ist die Anzahl dieser Komplexe am Promotor in der G1-Phase nach der Expression von E2F1 bis E2F3 deutlich reduziert (Takahashi et al., 2000). Diese Reduktion geht einher mit dem Zerfall von E2F4/DP-'*pocket*' Protein-Komplexen und der Relokalisation von E2F4/DP in das Cytoplasma (Takahashi et al., 2000). Die Entfernung von E2F4/p130 Komplexen an Cdc2-Promotor-Bindungsstellen findet synchron mit dem Cdc2 Expressionsstart statt (Tommasi und Pfeifer, 1995).

E2F4 und E2F5 wurden ebenfalls als Mediatoren von TGF β -vermittelter Wachstumsinhibition gefunden (Chen et al., 2002). Smad3/E2F4/E2F5/DP1/p107-Komplexe translozieren nach Behandlung mit TGF β vom Cytoplasma in den Zellkern. Im Zellkern wird dieser Komplex um Smad4 erweitert und bindet eine Smad-E2F-Promotor-Bindungsstelle im c-Myc-Promotor. Dies führt zur Repression dieses wachstumsstimulierenden Gens (Chen et al., 2002).

E2F6 unterscheidet sich ausgenommen von seiner Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomäne deutlich von den ersten fünf E2F-Proteinen (Abb. 1.2). Das Protein besitzt keine carboxyterminale Transaktivierungs- und '*pocket*' Protein-Bindungsdomäne (Morkel et al., 1997), daher wurde angenommen, daß es als Repressor von E2F-regulierten Genen fungiert. Es konnte gezeigt werden, daß es multiple Faktoren für die transkriptionelle Repression wie RYBP ('*Ring1 and YY1-binding protein*') und '*polycomb*' Gruppen-Proteine (PcG) bindet und den Promotor effektiv reprimiert (Trimarchi et al., 2001). Interessanterweise rekrutiert E2F6 chromatin-modifizierende Proteine und kann nicht nur E2F- sondern auch Myc-regulierte Promotoren reprimieren (Ogawa et al., 2002). E2F6 unterdrückt die transkriptionelle Aktivierung in ruhenden Zellen und wird durch die Expression von Transaktivatoren wie E2F1 nach Wiedereintritt in den Zellzyklus verdrängt.

Das murine E2F7 unterscheidet sich völlig von allen anderen Faktoren, weil es nur in seinen beiden DNA-Bindungsdomänen Sequenzhomologien aufweist. Außerdem besitzt es als einziges Mitglied eine zweite DNA-Bindungsdomäne während andere typische Domänen fehlen (DeBruin et al., 2003) (Abb. 1.2). E2F7 ist ebenfalls ein Repressor,

wobei dieser Effekt nicht universell, sondern auf bestimmte Promotoren beschränkt ist. E2F7 unterdrückt die Transaktivierung von E2F1. Es wird spekuliert, daß E2F7 Tumorsuppressorfunktion haben könnte (DeBruin et al., 2003).

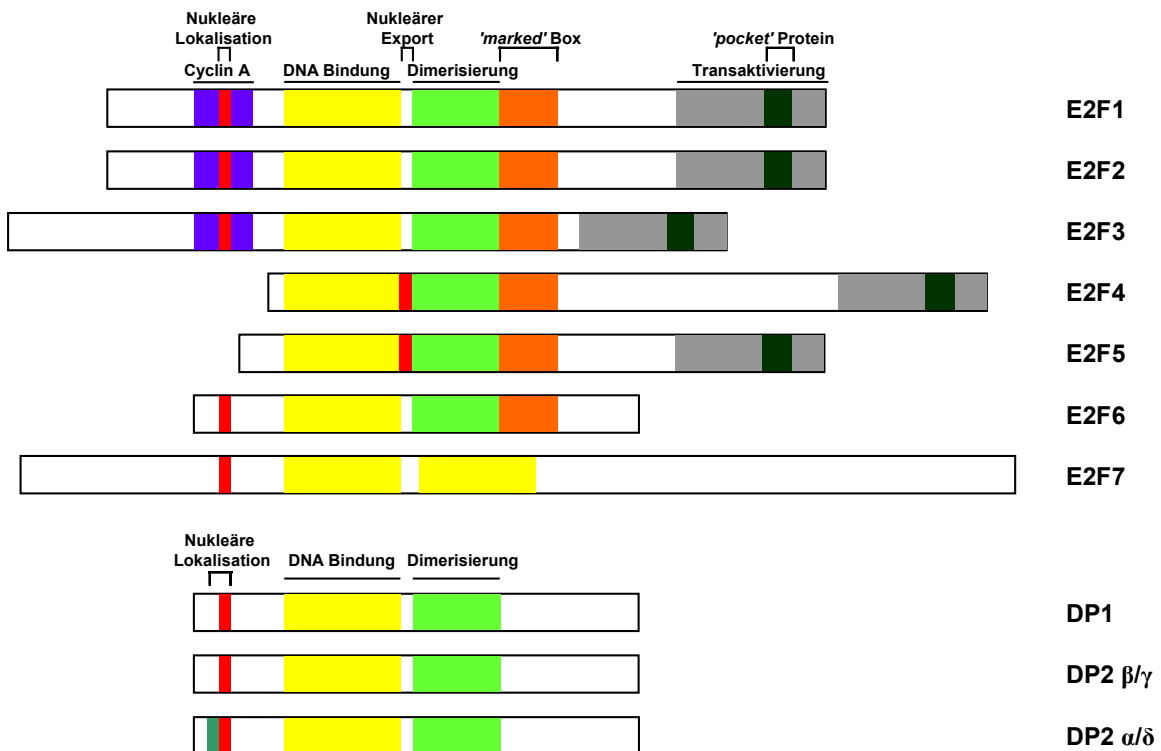


Abb. 1.2 Übersicht aller E2F- und DP-Familienmitglieder. Die erste E2F Untergruppe trägt ein nukleäres Lokalisationssignal und eine Cyclin A-Bindungsstelle. Die Mitglieder der zweiten Gruppe sind um diese beiden Domänen aminoterminal verkürzt, tragen dafür aber ein nukleäres Exportsignal. E2F6 (die dritte E2F Untergruppe) ist carboxyterminal um die Transaktivierungs- und 'pocket' Protein-Bindungsdomäne trunziert. E2F7 hat zwei DNA-Bindungsdomänen. DP- und E2F-Proteine besitzen Homologien in ihren Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomänen. Die Lokalisation von DP-Proteinen ist abhängig von einem zweiten nukleären Lokalisationssignal. Es existieren vier DP2 Isoformen. DP2 α/δ sind nukleär und DP2 β/γ cytoplasmatisch lokalisiert.

1.4 E2F-Regulation

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F unterliegt während des gesamten Zellzyklus einer strengen Regulation. Die E2F-Aktivität wird nicht nur durch 'pocket' Protein Bindung und Cdk4/Cyclin D bzw. Cdk2/Cyclin E reguliert, sondern auch durch Cdk2/Cyclin A beim Eintritt in die S-Phase (Xu et al., 1994). Durch diese Bindung zwischen E2F1 und Cdk2/Cyclin A wird DP1 phosphoryliert (Krek et al., 1995), was zum Verlust der DNA-Bindung und der ubiquitin-abhängigen Proteolyse von E2F1 und schließlich zum Austritt aus der S-Phase führt (Elledge und Harper, 1998). Während Cdk4/Cyclin D und Cdk2/Cyclin E die Transkriptionsinitiation und den S-Phase-Eintritt koordinieren, führt die Cdk2/Cyclin A Interaktion zur Terminierung der Synthesephase. Weiterhin wurde kürzlich gezeigt, daß E2F ebenfalls durch das 'murine double minute 2' (Mdm2) Onkoprotein und p19^{ARF} in seiner Aktivität reguliert wird (Loughran und La Thangue, 2000; Martelli et al., 2001; Mason et al., 2002).

E2F benötigt zur Aktivierung der Transkription die Bindung von p300/CBP Co-Aktivator-Familienproteinen (Trouche et al., 1996; Morris et al., 2000). p300/CBP-Proteine formen

nicht nur einen Multiproteinkomplex aus Komponenten, die für den Transkriptionsstart erforderlich sind wie TFIIB, das TATA-Box Bindeprotein (TBP) oder die RNA Polymerase II, sondern besitzen auch eine Histonacetyltransferase (HAT) Domäne, durch die sie die Chromatinstruktur lockern und die Zugänglichkeit für den Transkriptionsapparat erhöhen (Chan und La Thangue, 2001). Außerdem sorgen p300/CBP-Proteine für die Erhöhung der DNA-Bindungsaktivität und damit der transkriptionellen Aktivität und der Proteinstabilität von E2F1 durch spezifische Acetylierung von E2F1 durch den p300/CBP-assoziierten Faktor (PCAF) (Martinez-Balbas et al., 2000).

Die Komplexität dieser Regulation, die in ihrer Vollständigkeit noch nicht aufgeklärt ist, zeigt die enorme Bedeutung von E2F für die Transkriptionsinitiation.

1.5 Die Rolle von E2Fs für Proliferation, Differenzierung und Karzinogenese

E2Fs spielen eine maßgebliche Rolle in der Koordinierung vieler zellulärer Prozesse. Mausfibroblasten von *E2F1*^{-/-} Embryos zeigten einen verzögerten G0-Phase-Austritt, was für eine Regulation des zeitlich abgestimmten S-Phase-Eintritts durch E2F1 spricht (Wang et al., 1998). *E2F3*^{-/-} Mausembryofibroblasten dagegen zeigen eine reduzierte Expression von verschiedenen E2F-regulierten S-Phase Genen wie B-Myb, Cyclin A oder DHFR (Humbert et al., 2000a). Proliferierende primäre Zellen ließen sich durch E2F3-Antikörperinjektion in einen Zustand des Zellzyklusarrests versetzen, E2F1-Antikörperinjektion hingegen beeinflusste die Proliferation nicht (Leone et al., 1998). Synchronisierte Zellen zeigen eine DNA-Bindung von E2F3 an der G1/S-Phasengrenze, E2F1 jedoch konnte nur in der primären G1-Phase nach mitogenen Stimuli an der DNA gefunden werden (Leone et al., 1998). Daher reguliert E2F1 anscheinend das Verlassen der G0- und die initiale G1-Phase, E2F3 hingegen ist für den Ablauf der S-Phase durch Aktivierung spezifischer Gene verantwortlich. Zusätzlich ist E2F während der Mitose für die Akkumulation von Cyclin B und für den Schutz des '*anaphase-promoting complex*' vor Degradation verantwortlich (Lukas et al., 1999).

E2F-Proteinen konnten auch Funktionen bei der Regulation der Differenzierung zugeordnet werden. E2F4 '*knockout*' Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben durch fehlerhaft ablaufende Hämatopoese und durch Defekte bei der Darmepithelgewebeentstehung (Humbert et al., 2000b; Rempel et al., 2000). *E2F5*^{-/-} Mäuse sind dagegen lebens-, aber nicht überlebensfähig, da sie an Hydroencephalitis durch verstärkte Sekretion von cerebralen Spinalflüssigkeiten in den '*choroid plexus*' sterben (Lindeman et al., 1998). Bei Adipozyten und Granulozyten konnte gezeigt werden, daß eine Repression von E2F1/DP1 essentiell für deren Differenzierung und den Zellzyklusaustritt ist (Porse et al., 2001). Genauso ist die Repression von E2F1 bei der Keratinozytendifferenzierung essentiell (Dicker et al., 2000). Weiterhin scheint die Unterdrückung von E2F4 und E2F5 für die korrekte Differenzierung von Granulozyten zusätzlich zur E2F1-Repression von Bedeutung zu sein (Porse et al., 2001).

Das onkogene Potential von E2F1 wurde zuerst in klassischen onkogenen Kooperationsstudien *in vitro* beobachtet. E2F1 zeigte zusammen mit aktiviertem Ras in Softagar Transformationsassays kooperierende Wirkung. Derart transformierte Zellen wuchsen in Nacktmausmodellen zu Tumoren aus (Johnson et al., 1994). Darüber hinaus trieb die E2F1-Überexpression in transgenen Mäusen die Tumorigenese an (Pierce et al., 1999). Die Expression von E2F1, E2F2 und E2F3 zeigte ebenfalls transformierende Wirkung auf NIH3T3 Zellen (Xu et al., 1995). Es wurde gefunden, daß Tumore in E2F1-negativer Umgebung langsamer als in E2F1-Wildtyp Umgebung auswuchsen (Yamasaki et al., 1998), was für eine onkogene Funktion von E2F1 spricht. E2F1-Überexpression allein konnte jedoch keine Tumorentwicklung einleiten. Der Verlust von funktionellem p53 oder aktiviertes Ras waren für die Einleitung der Karzinogenese notwendig, und in Enterozyten konnte auch nach gezielter E2F1-Expression keine Tumorbildung beobachtet werden (Chandrasekaran et al., 1996). Die Tatsache, daß die Überexpression von E2F1 allein zur Tumorentstehung nicht ausreicht, ist eine Folge von E2F1-induzierter Apoptose (Pierce et al., 1998a).

Eine Vielzahl von Experimenten machen die Funktionen einzelner E2F-Proteine bei der Regulation von zellulärer Proliferation und Differenzierung deutlich (Dyson, 1998; Nevins, 1998). Wie bereits beschrieben reguliert E2F3 DNA-replikationsrelevante Gene bei der Proliferation (Leone et al., 1998; Humbert et al., 2000a). E2F4 ist an der Differenzierung verschiedener Zelltypen beteiligt und für den koordinierten Zellzyklusaustritt verantwortlich (Humbert et al., 2000b; Rempel et al., 2000). E2F1 besitzt duale Funktion: so treibt die Überexpression von E2F1 ruhende Zellen in die S-Phase (Johnson et al., 1993), während Zellen, denen E2F1 fehlt, diesen Faktor für ihre Proliferation benötigen (Wu et al., 2001). Zusätzlich induziert E2F1 in Abwesenheit von proliferativen Signalen Apoptose (Qin et al., 1994; Wu und Levine, 1994; Kowalik et al., 1995; DeGregori et al., 1997; Kowalik et al., 1998). So zeigen *E2F1*^{-/-} Mäuse durch Defekte bei der Apoptose von Thymozyten Hyperplasien (Field et al., 1996) und Mäuse ohne funktionelles pRb weisen durch dereguliertes E2F1 sehr starke Apoptose in sich entwickelnden Neuronen, Augen und Myozyten auf (Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992).

1.6 E2F1-vermittelte Apoptose

Anhand der Vielzahl der Studien wird die Bedeutung von E2F1 mit herausragender Stellung in der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie deutlich. Die Apoptoseinduktion durch E2F1-Überexpression konnte sowohl *in vitro* (Qin et al., 1994; Wu und Levine, 1994; Kowalik et al., 1995) als auch *in vivo* (Guy et al., 1996; Holmberg et al., 1998; Pierce et al., 1998b) beobachtet werden. Die Apoptosefunktion von E2F1 scheint physiologisch bedeutsam, da 'knockout' Mäuse eine drastisch erhöhte Anzahl von reifen T-Zellen besitzen, die auf fehlende Apoptoseeinleitung zurückzuführen ist (Field et al., 1996). Außerdem zeigen Mäuse ohne funktionelles pRb und E2F1 einen signifikant verminderten

S-Phasen-Eintritt und Apoptose (Tsai et al., 1998). E2F1 stellt das Bindeglied in pRb-vermittelter Apoptose dar, weil die durch pRb-Inaktivierung hervorgerufene Induktion von unregulierter Apoptose und Proliferation in murinem Hirnepithelgewebe durch E2F1-Inaktivierung inhibiert werden kann (Pan et al., 1998b).

Obwohl in *Rb*-defizienten Mäusen nach E2F3 Verlust ebenfalls die Unterdrückung von Apoptoseinduktion beobachtet werden konnte (Ziebold et al., 2001; Saavedra et al., 2002), und auch in manchen Untersuchungen (Vigo et al., 1999) durch E2F2- und E2F3-Überexpression Apoptose eingeleitet werden konnte, wurde dieser Effekt in anderen Systemen nicht gefunden (Kowalik et al., 1998).

Durch ektope Expression von E2F1, E2F2 und E2F3 konnte gezeigt werden, daß diese Faktoren zwar vergleichbar die Genexpression beeinflussen und die DNA-Synthese induzieren, jedoch nur E2F1 in der Lage ist, in ausreichendem Maße Apoptose zu induzieren (DeGregori et al., 1997). Ob daher die durch E2F2 und E2F3 induzierte Apoptose E2F1-abhängig ist, müssen zukünftige Studien zeigen.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die E2F1 '*marked box*' die essentielle Domäne für die Apoptoseinduktion darstellt und so die E2F1-Funktionsweise von allen anderen E2F Mitgliedern unterscheidet (Hallstrom und Nevins, 2003).

In Zellkultur und transgenen Mausmodellen wurde gezeigt, daß E2F1-induzierte Apoptose sowohl p53-abhängig (Qin et al., 1994; Wu und Levine, 1994; Pierce et al., 1998a), als auch unabhängig von diesem Tumorsuppressor (Philips et al., 1997; Holmberg et al., 1998) ablaufen kann. Und obwohl mehrere apoptoserelevante Gene transkriptionell von E2F1 reguliert werden, ist die Apoptoseinduktion von E2F1 unabhängig von dessen Transaktivierungsdomäne (Hsieh et al., 1997; Phillips et al., 1999; Stanelle et al., 2003).

E2F1 induziert die p53 Akkumulation (Hiebert et al., 1995; Kowalik et al., 1995) durch direkte Transaktivierung (Bates et al., 1998; Robertson und Jones, 1998) von p14^{ARF} (murines Homolog p19^{ARF}). p14^{ARF} inhibiert durch Interaktion die E3 Ubiquitin Ligaseaktivität des '*murine double minute 2*' (Mdm2) Protein und verhindert so die Ubiquitylierung und anschließende Degradation von p53 (Weber et al., 1999). Durch diesen Mechanismus wird p53 stabilisiert und in seiner Aktivität unterstützt. p14^{ARF} stellt die Verbindung zwischen E2F1 und p53 dar, ist aber nicht essentiell für die onkogen induzierte p53-abhängige Apoptose (Russel et al., 2002; Tolbert et al., 2002; Tsai et al., 2002) (Abb. 1.3). Teilweise konnte sogar verstärkte E2F1 Apoptoseinduktion gefunden werden, wenn kein funktionelles p14^{ARF} anwesend war (Russel et al., 2002; Tsai et al., 2002). Überexpressionsstudien mit p14^{ARF} zeigten, daß E2F1 durch diesen Faktor für die Degradation zugänglich gemacht wird (Martelli et al., 2001). In p14^{ARF}-negativer Umgebung wurde eine p53 Phosphorylierung gezeigt, die auch bei DNA-Schädigung an den gleichen Aminosäureresten von p53 beobachtet wird (Rogoff et al., 2002; Russel et

al., 2002). Diese Phosphorylierung konnte durch Gabe von Koffein verhindert werden, was auf eine Beteiligung der '*ataxia telangiectasia mutated*' (ATM) und '*ataxia telangiectasia and Rad3-related*' (ATR) Kinasen, die am Signalweg der DNA-Schädigungen beteiligt sind, schließen lässt, da diese Kinasen von Koffein inhibiert werden (Rogoff et al., 2002). Auf dem gleichen Signalweg wurde 'upstream' die E2F1-Aktivität durch Faktoren des DNA-Schädigungssignalweges aktiviert und führte zu erhöhten E2F1-Proteinmengen (Blattner et al., 1999). E2F1 wird sehr wahrscheinlich in gleicher Weise wie p53 durch ATM und ATR Kinasen phosphoryliert (Lin et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß E2F1 durch eine weitere sog. '*checkpoint*' Kinase (Chk2 = '*checkpoint kinase 2*') des DNA-Schädigungsapparates phosphoryliert wird, was zur E2F1-Expression und Apoptoseinduktion führt (Stevens et al., 2002). Obwohl die Mechanismen dieser Kinasen-Beteiligung noch nicht aufgeklärt sind, ist deren Beteiligung an der Apoptoseinduktion weitestgehend gesichert.

Hsieh et al. (2002) konnten zeigen, daß E2F1 eine Protein-Protein-Interaktion mit p53 über die Cyclin A-Bindungsdomäne eingeht, die keine Transaktivierungs- oder DNA-Bindungsdomäne erfordert und so die p53-vermittelte Apoptoseaktivität entscheidend anregt.

Auf dem p53-unabhängigen Apoptoseweg induziert E2F1 Apoptose vor allem über die direkte Transaktivierung des p53-homologen Faktors p73 (Irwin et al., 2000; Stiewe und Pützer, 2000), des '*apoptosis protease-activating factor 1*' (Apaf-1) (Moroni et al., 2001) und durch Aktivierung der Caspasen 3, 7, 8 und 9 (Nahle et al., 2002).

p73 sorgt für die Transaktivierung von p53-responsiven Zielgenen, die schließlich zur Apoptose führen (Stiewe und Pützer, 2000). Apaf-1 hingegen lagert sich mit aus den Mitochondrien freigesetztem Cytochrom c zusammen und aktiviert Pro-Caspase 9, was wiederum zur Aktivierung von 'downstream' Effektor-Caspasen und am Ende zur Einleitung von Apoptose führt (Zou et al., 1999) (Abb. 1.3).

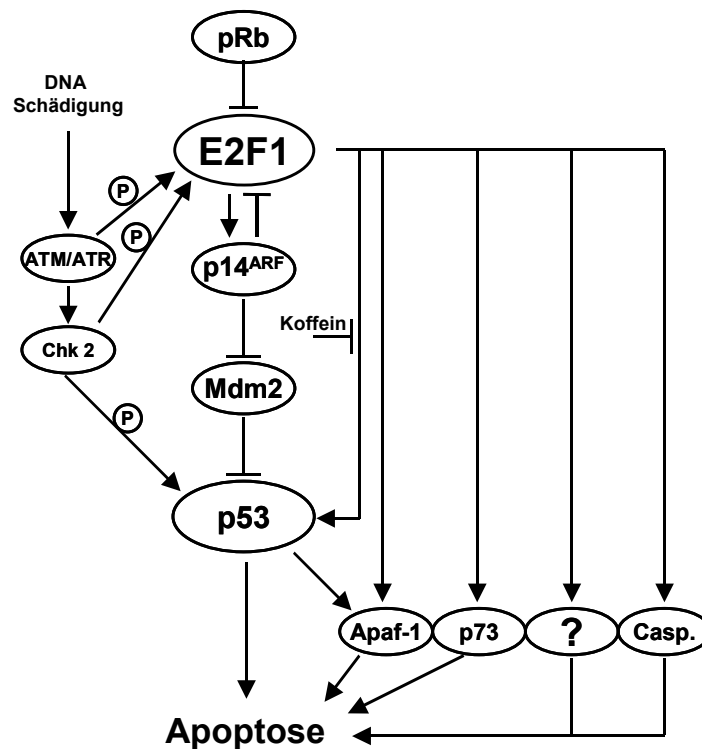


Abb. 1.3 E2F1-Apoptose Signalwege. E2F1 induziert p53 abhängig von p14^{ARF} und unabhängig von diesem Protein. Apoptose wird p53-unabhängig durch p73, Apaf-1, Caspasen-Aktivierung und durch bisher unbekannte Faktoren induziert. DNA-Schädigung führt zur Phosphorylierung von E2F1 und p53 durch ATM/ATR und Chk2 Kinasen.

Die Caspase-Aktivierung sorgt im Fall der Initiator-Caspasen 8 und 9 für den Beginn der Caspase-Kaskade und trägt entscheidend dazu bei, endogene apoptoseinhibierende Signale zu überkommen. Die Effektor-Caspasen 3 und 7 dagegen sorgen für eine effizient koordinierte Ausführung des programmierten Zelltodes (Nahle et al., 2002).

1.7 Signalwege E2F1-induzierter Apoptose

Es existieren mindestens drei Signalwege, die durch die Expression von E2F1 zur Einleitung der Apoptose führen. Diese kooperieren untereinander und sind miteinander vernetzt: zum einen werden anti-apoptotische Signalwege unterdrückt, andererseits stellt die Stabilisierung von p53 einen weiteren Weg bei der Einleitung von Apoptose dar. Die dritte Komponente ist die direkte Aktivierung von p53-unabhängigen Faktoren wie p73, Apaf-1 oder die Caspase-Aktivierung, wobei Apaf-1 und die Caspasen mit dem Signalweg der Inhibition anti-apoptotischer Signale verbunden sind.

Es existieren zwei Hauptsignaltransduktionswege bei der Apoptoseinduktion. Einerseits werden Signale von externen Liganden über einen extrinsischen rezeptorvermittelten (sog. *'death receptor'*) Weg weitergeleitet, was nach Rezeptoraktivierung in der sukzessiven Aktivierung einer Caspase-Kaskade unter Einbeziehung von Caspase-8 resultiert (Ashkenazi und Dixit, 1998).

Ein alternativer Weg verläuft intrinsisch über die Mitochondrien. Die Mitochondrien werden durch apoptotische Signale zur Cytochrom c Freisetzung in das Cytoplasma angeregt (Green und Reed, 1998), was in der Aktivierung von Apaf-1 und Pro-Caspase-9 resultiert

(Zou et al., 1999). Die Freisetzung von Cytochrom c wird dabei von Mitgliedern der Bcl-2 Familie reguliert (Green und Reed, 1998). In mehreren DNA-Mikroarray-Studien wurde nach Einleitung des programmierten Zelltodes die Transaktivierung von pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie wie Bok, Bad, Bak und Bid1 gefunden (Ma et al., 2002; Polager et al., 2002; Stanella et al., 2002). Es läßt sich daher spekulieren, daß diese Proteine am genannten Signalweg beteiligt sind. Die Translokation von Cytochrom c aus den Mitochondrien nach apoptotischen Stimuli konnte bisher nur in Zellen mit funktionellem p53 Wildtyp beobachtet werden (Moroni et al., 2001; Furukawa et al., 2002). Zusätzlich zu Cytochrom c treten SMAC/Diablo-Proteine aus den Mitochondrien in das Cytosol über und greifen '*inhibitors of apoptosis proteins*' (IAPs) an den Caspasen an, was zur leichteren Aktivierbarkeit der Caspasen führt (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000). Beide Signalwege laufen in der Aktivierung der Effektor-Caspase-3 zusammen und führen nach sukzessiver Aktivierung weiterer Proteine wie der '*caspase activated DNase*' (CAD) zur Apoptoseeinleitung (Rathmell und Thompson, 1999).

Ein rezeptorvermittelter Signalweg, der des TNF-Rezeptors ('*tumor necrosis factor*'), ist gut aufgeklärt und ist nicht nur fähig Apoptoseinduktion durch Aktivierung von Caspase-8 einzuleiten, sondern auch durch Induktion von NF κ B und JNK anti-apoptotische Prozesse anzusteuern (Hsu et al., 1995; Liu et al., 1996) (Abb 1.4). Es konnte gezeigt werden, daß E2F1 den anti-apoptotischen NF κ B Weg stört (Phillips et al., 1999; Tanaka et al., 2002). Phillips et al. (1999) beobachteten eine Herunterregulation des TNF-Rezeptor-Proteins TRAF2 durch TNF α und damit eine verminderte Apoptoseinhibition durch NF κ B und JNK. Diese Apoptose fördernde Inhibition war unabhängig von der E2F1-Transaktivierungsdomäne.

Obwohl bisher verschiedene p53-unabhängige Signalwege identifiziert wurden, ist die p53-vermittelte Apoptose dennoch ein entscheidender zellulärer Mechanismus. E2F1 induziert p14^{ARF}-abhängig (Bates et al., 1998) und unabhängig von diesem Faktor die p53-Stabilisierung (Russel et al., 2002) (Abb 1.3). Außerdem wurde eine E2F1-p53-Interaktion von Hsieh et al. (2002) beschrieben, die ebenfalls zur Apoptoseeinleitung führt. Eine zusätzliche p53-Stabilisierung könnte darauf zurückzuführen sein, daß p73 von Mdm2 gebunden, allerdings nicht degradiert wird (Balint und Vousden, 1999; Dobbstein et al., 1999; Zeng et al., 1999). Deshalb wird spekuliert, daß diese Bindung die Aktivität von Mdm2 abfängt und so die p53-Degradation verhindert wird (Phillips und Vousden, 2001).

Die dritte Komponente E2F1-induzierter Apoptose bildet die Transaktivierung von p53-unabhängigen Faktoren. Hierzu zählen die Aktivierung von p73, was zur Induktion von klassischen p53-responsiven pro-apoptotischen Zielgenen wie p21 und schließlich zur Apoptose führt (Stiewe und Pützer, 2000). Als weiterer Bestandteil p53-unabhängiger Apoptose wird Apaf-1 von E2F1 direkt transaktiviert (Moroni et al., 2001); nach Freisetzung von Cytochrom c oligomerisiert ein Komplex das sog. 'Apoptosom' aus Cytochrom c und Apaf-1 (Li et al., 1997; Hu et al., 1999); dieser Komplex rekrutiert Pro-Caspase-9 und aktiviert diese (Zou et al., 1999), was nach Freisetzung von aktivierter Caspase-9 zu sukzessiver Aktivierung der Caspase-Kaskade führt (Pan et al., 1998a; Srinivasula et al., 1998). Die Tatsache, daß Apaf-1 ebenfalls durch p53 aktiviert wird, zeigt, daß eine Vernetzung der Signalwege besteht, bei der im Falle des Verlustes einer Komponente andere Faktoren die Funktionen zumindest teilweise übernehmen können. E2F1 kann neben den beschriebenen Netzwerken ebenfalls direkt die Caspasen 3, 7, 8 und 9 aktivieren (Nahle et al., 2002) und so für die Apoptose relevante Mechanismen direkt ansteuern.

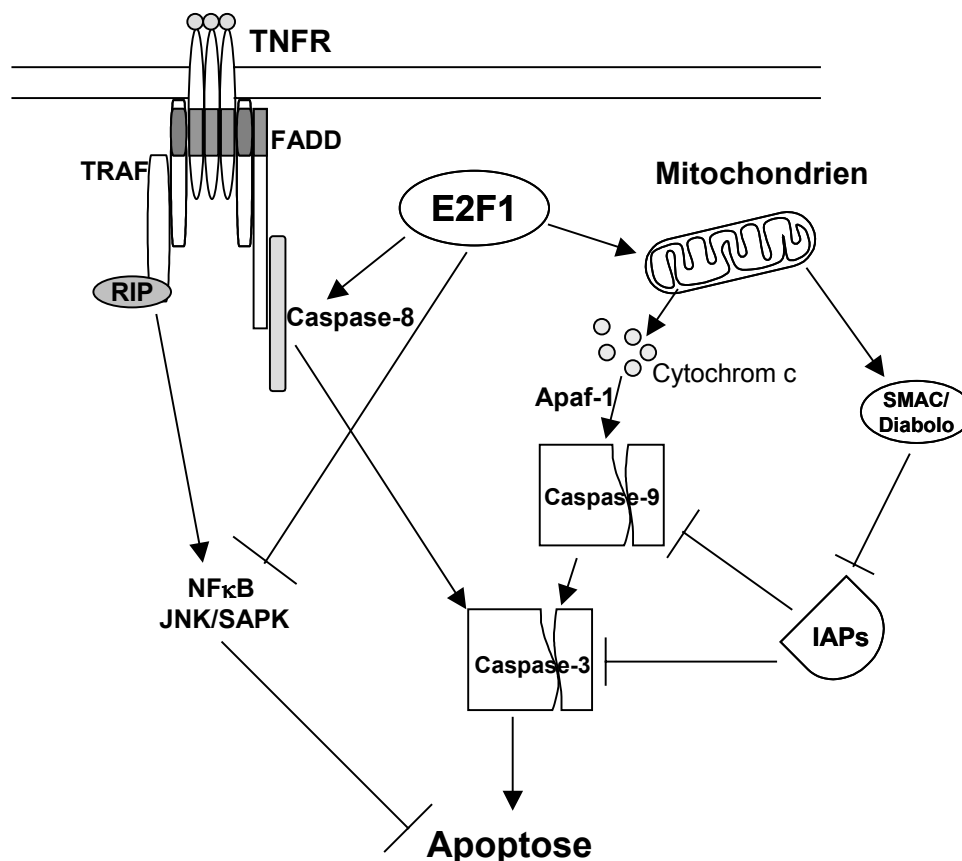


Abb. 1.4 Mitochondriale und rezeptorvermittelte pro-apoptotische Signalwege. Apoptotische Signale führen über den TNF-Rezeptor unter Caspase-8 Aktivierung und NFκB bzw. JNK/SAPK Inhibierung zur Apoptose. Aktivierte Mitochondrien setzen Cytochrom c und SMAC/Diablo frei und induzieren so die Caspase-Kaskade. E2F1 kann auf beide Signalwege einwirken.

Zusammenfassend wird deutlich, daß dereguliertes E2F1 eine Reihe von Signalwegen ansteuern kann, um seine pro-apoptotische Aktivität auszuüben. Dennoch sind nicht alle Mechanismen völlig aufgeklärt und einige Fragen bleiben offen. In DNA-Mikroarray-Studien sind eine Vielzahl von interessanten potentiellen E2F1-regulierten Zielgenen gefunden worden (Müller et al., 2001). Die Evaluierung dieser Faktoren für die Apoptose wird maßgeblich zum besseren Verständnis der Netzwerke und des Potentials E2F1-induzierter Apoptose beitragen. Außerdem ist es bisher nur unzureichend verstanden, unter welchen Umständen E2F-Aktivität zur Proliferation oder zum Zelltod führt.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Einleitung von Apoptose ist ein entscheidender Schutzmechanismus bei der Tumorentstehung. Diese Schutzfunktion wird wesentlich durch das Tumorsuppressorprotein p53 vermittelt, ist aber durch Mutationen des p53-Gens oder dessen funktionelle Inaktivierung in nahezu allen Tumoren außer Kraft gesetzt. Tumoren mit p53 Mutationen zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung (Lowe et al., 1994). In gentherapeutischen Ansätzen konnte die Funktion des p53 Tumorsuppressors durch Transfer des p53-Wildtyp Gens wieder hergestellt werden (Pützer et al., 1998). Da über den p53-unabhängigen Apoptose-Weg und die dabei beteiligten Gene/Faktoren nur wenig bekannt ist, erlangt die Untersuchung der hierbei entscheidenden Proteine eine wichtige Bedeutung für unser Verständnis der ablaufenden Prozesse.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, E2F1-regulierte Apoptosegene zu identifizieren, die unabhängig vom p53-Status der Zelle aktiviert werden. Der Nachweis dieser Gene als potentielle Tumorsuppressorgene kann neben der Aufklärung der molekularen Mechanismen der Apoptoseinduktion die Grundlage für neue p53-unabhängig wirksame Therapeutika bei der Gentherapie humaner Malignome bilden.

Im Verlauf dieser Arbeit standen folgende Schwerpunkte im Vordergrund:

1. Durch DNA-Mikroarray-Analysen sollten positiv regulierte E2F1-Zielgene identifiziert werden.
2. Nach Verifizierung der Array-Daten durch unabhängige Untersuchungen sollten aussichtsreiche Kandidaten in Volllänge kloniert und funktionell charakterisiert werden.
3. Die Bedeutung der identifizierten E2F1-regulierten Gene für die E2F1-vermittelte Apoptose sollte in bezug auf bisher bekannte Apoptose-Signalwege eingeordnet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Puffer, Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden in *pro analysi* - Qualität von Amersham-Biosciences (Freiburg), Biomol (Hamburg), Biorad (München), Fluka (Neu-Ulm), Fresenius (Bad Homburg), GibcoLifetechnologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Roth (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Die daraus hergestellten Lösungen und Puffer wurden nach Standardprotokollen hergestellt (Sambrook et al., 1989).

Es wurden DNA-modifizierende Enzyme von Eppendorf (Hamburg), Invitrogen (Groningen, NL), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.1.2 Kits

Es wurden folgende Kits zur Herstellung, Aufreinigung und Modifikation von Nukleinsäuren, Proteinen und Adenoviren verwendet:

ApoAlert (BD Clontech, Heidelberg)

GeneSuppressor System (Biocarta, Hamburg)

Human Life Grid 1.0 Array System (Incyte, Heidelberg)

Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)

Omniscript RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden)

PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg)

RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden)

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)

Strip-EZ RT Kit (Ambion, Austin, TX, USA)

Super-Signal Dura West Extended Kit (Pierce, Bonn)

TNT T7 Quick coupled Transcription/Translation System (Promega, Mannheim)

TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, NL)

2.1.3 Plasmidvektoren

Plasmid	Beschreibung
pAdEasy1	Plasmid aus Ad5 Genom; zur Verfügung gestellt von B.Vogelstein, Baltimore, MD, USA; (He et al., 1998).
pAdTrack.CMV.KIAA0455	Adenoviraler 'Shuttle'-Vektor nach Einführung der kompletten KIAA0455 kodierenden Gensequenz. Ursprungsplasmid AdTrackCMV zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, MD, USA; (He et al., 1998).
pAdTrack.CMV.KIAA0717	Adenoviraler 'Shuttle'-Vektor nach Einführung der kompletten KIAA0717 kodierenden Gensequenz.
pAdTrack.CMV.KIAA0767/Dip	Adenoviraler 'Shuttle'-Vektor nach Einführung der kompletten KIAA0767/Dip kodierenden Gensequenz.
pBabeHA-ER-E2F1	Retroviraler CMV Expressionsvektor nach Einführung der HA-ER-E2F1 kodierenden Sequenz. Zur Verfügung gestellt von K. Helin, Mailand, Italien (Vigo et al., 1999).
pCDNA 3.1/ myc-His	CMV Expressionsvektor. Invitrogen, Groningen, NL.
pCDNA 3.1/ myc-His. KIAA0455	CMV Expressionsvektor nach Einführung der kompletten KIAA0455 kodierenden Gensequenz.
pCDNA 3.1/ myc-His. KIAA0717	CMV Expressionsvektor nach Einführung der kompletten KIAA0717 kodierenden Gensequenz.
pCDNA 3.1/ myc-His. KIAA0767/Dip	CMV Expressionsvektor nach Einführung der kompletten KIAA0767/Dip kodierenden Gensequenz.
pCR2.1-TOPO.KIAA0455	PCR2.1-TOPO PCR Fragment Klonierungsplasmid nach Einführung der kompletten KIAA0455 kodierenden Gensequenz.
pCR2.1-TOPO.KIAA0717	PCR2.1-TOPO PCR Fragment Klonierungsplasmid nach Einführung der kompletten KIAA0717 kodierenden Gensequenz.
pCR2.1-TOPO.KIAA0767/Dip	PCR2.1-TOPO PCR Fragment Klonierungsplasmid nach Einführung der kompletten KIAA0767/Dip kodierenden Gensequenz.
pGL3 basic	Luciferase Expressionsvektor ohne Promotor und Enhancer Sequenzen. Promega, Mannheim.
pGL3.7kB Promotor	Luciferase Expressionsvektor nach Einführung eines 7 Kilobasen Promotorfragmentes des KIAA0767 Promotors.
pGL3.-98bp Promotor	Luciferase Expressionsvektor nach Einführung eines 98 bp Promotorfragmentes des KIAA0767 Promotors.

pGL3.-206bp Promotor	Luciferase Expressionsvektor nach Einführung eines 206 bp Promotorfragmentes des KIAA0767 Promotors.
pGL3.-358bp Promotor	Luciferase Expressionsvektor nach Einführung eines 358 bp Promotorfragmentes des KIAA0767 Promotors.
pCMV.E2F1	CMV Expressionsvektor; exprimiert E2F1. Konstrukt war in der Arbeitsgruppe vorhanden; (Stiewe und Pützer, 2000).

Alle hier beschriebenen Vektoren wurden, wenn nicht anders angegeben, im Rahmen dieser Arbeit generiert.

2.1.4 Adenoviren

Virus	Beschreibung
Ad.CMV.GFP	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Fusionsprotein GFP-Spektrin unter CMV-Promotor-Kontrolle. Konstrukt war in der Arbeitsgruppe vorhanden; (Pützer et al., 2000).
Ad.CMV.p53wt	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das humane p53 Wildtyp-Protein unter CMV-Promotor-Kontrolle. Konstrukt war in der Arbeitsgruppe vorhanden; (Pützer et al., 2000).
Ad.CMV.KIAA0455	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das humane KIAA0455-Protein unter CMV-Promotor-Kontrolle.
Ad.CMV.KIAA0717	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das humane KIAA0717-Protein unter CMV-Promotor-Kontrolle.
Ad.CMV.KIAA0767/Dip	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das humane KIAA0767/Dip-Protein unter CMV-Prom.-Kontrolle.
Ad.CMV.KIAA0767/Dip His tag	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das humane KIAA0767/Dip-Protein inklusive eines His 'tags' unter CMV-Promotor-Kontrolle.
Ad.CMV.ER-E2F1	Adenoviraler Erstgenerationsvektor exprimiert, das Fusionsprotein ER-E2F1 unter CMV-Promotor-Kontrolle. Konstrukt war in der Arbeitsgruppe vorhanden; (Stanelle et al., 2003).
Ad.CMV.p73 α	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das humane p73 α -Protein unter CMV-Promotor-Kontrolle. Konstrukt war in der Arbeitsgruppe vorhanden; (Stiewe et al., 2002).

Ad.CMV.p73 β	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das humane p73 β -Protein unter CMV-Promotor-Kontrolle. Konstrukt war in der Arbeitsgruppe vorhanden; (Stiewe et al., 2002).
Ad.siGFP	Adenoviraler Erstgenerationsvektor exprimiert 'small interfering' RNAs (siRNAs) gegen GFP.
Ad.siKIAA0767/Dip	Adenoviraler Erstgenerationsvektor exprimiert siRNA gegen Exon 12 von KIAA0767/Dip.

Alle hier beschriebenen Viren wurden, wenn nicht anders angegeben, im Rahmen dieser Arbeit generiert.

2.1.5 Antikörper

Name	Bezeichnung	Zielsequenz	Herkunft
Actin	I-19 / sc-1616	Carboxyterminus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Cleaved PARP	9541	Asp 214; 89 kD Fragment	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Cox 4	S2207	unbekannt	BD Clontech, Heidelberg
Cytochrome c	S2050	unbekannt	BD Clontech, Heidelberg
Dip	#49 (benutzt)	Epitop aa 2-16	Eurogentec, Seraing, Belgien
Dip	#50	Epitop aa 496-511	Eurogentec, Seraing, Belgien
E2F1	KH95 / sc-251	Rb-Bindungsdomäne v. E2F1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
E2F1	C-20 / sc-193	Carboxyterminus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
HA tag	F-7 / sc-7392	Internes Epitop	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
His tag	R930-25	6 x His	Invitrogen, Groningen, NL
p53	FL-393/sc-6243	Internes Epitop zwischen aa 1-393	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
p73	Ab-2/ER-15	Internes Epitop zwischen aa 380-495	Oncogene Research, Schwalbach
PARP	9542	Asp 214; 24, 89, 116 kD Fragment	Cell Signaling Technology, Frankfurt

2.1.6 Oligonukleotide

Primer für die RT-PCR:

Primer	Sequenz
ARHGAP4 sense	5'-GGGCTGCAGGCTGAGTATGA-3'
ARHGAP4 antisense	5'-AATGTGACTCAGGCGCTGGG-3'
BAD sense	5'-ACGGAGGACGACGAAGGGAT-3'
BAD antisense	5'-GAGCTTCCCCTGCCCAAGTT-3'
BAK1 sense	5'-GCTTCTGAGGAGCAGGTAGC-3'
BAK1 antisense	5'-AAGCCCAGAAGAGCCACCAC-3'
BID sense	5'-TCGCCACTGGGACACTGTGA-3'
BID antisense	5'-GGTGCCTGGCAATATTCCGG-3'
CYCLIN E sense	5'-CAACATACAGACCCACAGAG-3'
CYCLIN E antisense	5'-CCTTTAGGTCAAGTAGCACC-3'
E2F1 sense	5'-GGTGAGGTCCCCAAAGTCAC-3'
E2F1 antisense	5'-GCCACCATAGTGTCAACCACC-3'
FGF-2 sense	5'-GGCCACTTCAAGGACCCCAA-3'
FGF-2 antisense	5'-GCCCAGTTCGTTTCAGTGCC-3'
GAPDH sense	5'-CACAGTCCATGCCATCAC-3'
GAPDH antisense	5'-CACCACCCTGTTGCTGTA -3'
IFNA2 sense	5'-TGTGATCTGCCTCAAACCCA-3'
IFNA2 antisense	5'-AGGTCATTCAGCTGCTGGTA-3'
KIAA0455 sense	5'-ACTGTCTTCTTGAAATCAAC-3'
KIAA0455 antisense	5'-TTGCAAGATACATTCAGAGA-3'
KIAA0717 sense	5'-TGTGGTTTTTGTCTCCCGCC-3'
KIAA0717 antisense	5'-AACATTGGTGTCCCTGTCCC-3'
KIAA0767/Dip sense	5'-GTCTGTAGCTGGGGACCAGT-3'
KIAA0767/Dip antisense	5'-TCAGGACAAGCTGAGGGAGC-3'
MAP3K14 sense	5'-ACCGAGAAGAAGTCCACTGG-3'
MAP3K14 antisense	5'-GGCCATCAGGTTGAAGACAC-3'
MMP16 sense	5'-TCCTTACCCACCCGGAGACT-3'
MMP16 antisense	5'-TCAGTCGGTGGAAGGTAGCC-3'
p73 sense	5'-GACGGAATTCACCACCATCCT-3'
p73 antisense	5'-CCAGGCTCTCTTTCAGCTTCA-3'
PAWR sense	5'-CAGCTTCGGCACACTTGGGA-3'
PAWR antisense	5'-AGGAAGTCTGTGGTGCTGCC-3'
RAD52 sense	5'-GGCGCAGGTCAACCAGAATC-3'
RAD52 antisense	5'-TGCTGCGTGATGGAGTGTGC-3'
RFC3 sense	5'-CGAGCTGCCATGAGCCTCTG-3'

RFC3 antisense	5'-CTGGGAGCAGGCACACGAAC-3'
STK15 sense	5'-GAGCATTGGCCTCTGGCTGG-3'
STK15 antisense	5'-ATCTGGCCCAGGGGAAGACC-3'
VEGF-B sense	5'-CCTGGCCACCAGAGGAAAGT-3'
VEGF-B antisense	5'-ATCTCCCCCAGCTGACTGCT-3'

Oligonukleotide für die Vollängenamplifikation:

Oligonukleotid	Sequenz
KIAA0455 sense	5'-ATGAATATGTTTGATGCTGACACA-3'
KIAA0455 antisense	5'-ATCCTTATAAGCCCGTGTGG-3'
KIAA0717 sense	5'-ATGGATTCTGACATGGATTATGAAAGG-3'
KIAA0717 antisense	5'-GACCACAGCCGAGGAGGAAG-3'
KIAA0767/Dip sense	5'-ATGCTAAGGAGGTTGGACAAAATC-3'
KIAA0767/Dip antisense	5'-GCTGTCCCCGCCAGACG-3'

Oligonukleotide für die Promotor-Klonierung:

Oligonukleotid	Sequenz
Promotor sense	5'-GCGAGGTCCGCGGTACCTTC-3'
Promotor antisense	5'-CCCAGCTGGCAGGACTGAGG-3'
+358 Promotor	5'-GAGAACCTGGCTTCCTTCT-3'
+206 Promotor	5'-TCTTTGGAAAGCTGGACCGG-3'
+98 Promotor	5'-TCTTTGGAAAGCTGGACCGG-3'
-21 Promotor	5'-CTAACATGACGCTCGGGTTC-3'

Oligonukleotide für die siRNA Technologie:

Oligonukleotid	Sequenz
XhoI Primer	Xho I 5'- <u>TCG</u> AGGACTCTATGCTGGTATCAatcgat TGATACCAGCATAGAGTCC-3'
XbaI Primer	Xba I 5'- <u>CTA</u> GGGACTCTATGCTGGTATCAatcgat TGATACCAGCATAGAGTCC-3'

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen mit Ad5-E1A stabil transformiert; (Graham et. al., 1977).
AsPC-1	Humane Pankreaskarzinomzellen. Zur Verfügung gestellt von D.I. Smith, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.
H1299	Humane kleinzellige Bronchialkarzinomzellen; zur Verfügung gestellt von B. Opalka; Innere Tumorklinik, Universitätsklinikum Essen.
H1299 ER-E2F1	Humane kleinzellige Bronchialkarzinomzellen; stabil transfiziert mit pBabeHA-ER-E2F1; exprimiert Fusionsprotein HA-ER-E2F1.
HCT -/-	Humane p53 negative Colonkarzinomzellen. Zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, MD, USA.
HCT +/-	Humane p53 positive Colonkarzinomzellen. Zur Verfügung gestellt von B. Vogelstein, Baltimore, MD, USA.
HeLa	Humane Cervixkarzinomzellen. ATCC, Rockville, MD, USA.
HepG2	Humane Hepatocelluläre Karzinomzellen. ATCC, Rockville, MD, USA.
K562	Humane chronische myeloische Leukämiezellen. DSMZ, Braunschweig.
MCF-7	Humane Brustadenokarzinomzellen. ATCC, Rockville, MD, USA.
Saos-2	Humane osteogenische Sarkomzellen. DSMZ, Braunschweig.
Saos-2 ER-E2F1	Humane osteogenische Sarkomzellen; retroviral stabil transfiziert; exprimiert Fusionsprotein HA-ER-E2F1. Zelllinie war in der Arbeitsgruppe vorhanden; (Stiewe und Pützer, 2000).
Sk-OV-3	Humane ovariale Adenokarzinomzellen. ATCC, Rockville, MD, USA.
VH6	Humane Vorhautfibroblasten. Zur Verfügung gestellt von M. Roggendorf, Institut für Virologie, Universitätsklinikum Essen.

2.1.8 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1-Blue	$\Delta(\text{mcra})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 relA1}$ $\text{lac}[F' \text{ pro AB}^+ \text{ lacI}^q \text{Z}\Delta\text{M15 Tn10 (tet}^r\text{)}]$
<i>E. coli</i> XL2-Blue	$\text{recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac}[F' \text{ proAB}^+$ $\text{lacI}^q \text{Z}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^r\text{) Amy Cam}^r]$
<i>E. coli</i> XL10-Gold	$\text{Tet}^r \Delta(\text{mcrA}) 183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr}) 173 \text{ endA1 supE44 thi-1}$ $\text{recA1 gyrA96 relA1 lac Hte } [F' \text{ pro AB lacI}^q \text{Z}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^r\text{) Amy}$ $\text{Cam}^r]$
<i>E. coli</i> Top10F'	$F' [\text{lacI}^q \text{ Tn10 (Tet}^r\text{)}] \text{ mcrA } \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC}) \phi 80 \text{ lacI}^q \text{Z}\Delta\text{M15}$ $\Delta\text{lacX74 recA1 araD139 } \Delta(\text{ara-leu})7697 \text{ galU galK rspL (Str}^r\text{)}$ endA1 nupG
<i>E. coli</i> BJ5183	$\text{EndA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Str}^r\text{)}$

XL-1 Blue, XL-2 Blue und XL-10 Gold wurden von Stratagene, Heidelberg und Top10F' von Invitrogen, Groningen, NL bezogen.

Der Stamm BJ5183 wurde von B. Vogelstein, Baltimore, MD, USA zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Transfektionen

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in einer 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre in Kultur gehalten. Zum Passagieren wurden die Zellen nach Mediumentfernung mit 37°C warmem PBS⁺ gespült, anschließend mit Trypsin (2,5 mg/ml Trypsin-Lsg.) benetzt und sodann von der beschichteten Zellkulturschale gelöst. Ein Aliquot dieser Zellen wurde auf eine frische Zellkulturschale mit Medium gegeben. Suspensionszellen wurden durch 10minütige Zentrifugation bei 300 x g und 4°C gesammelt und dann ein Aliquot hiervon in eine neue Zellkulturflasche überführt. Alle verwendeten Zellkulturmedien enthielten 10% fetales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl der Zellen wurde durch Auszählen entsprechender Verdünnungen von Zellsuspensionen im Neubauer Hämatozytometer durchgeführt. Zur Unterscheidung vitaler von schadhafte Zellen wurde ein gleiches Volumen einer 0,5%igen Trypanblau Lösung zugegeben.

2.2.1.3 Calciumphosphattransfektion

Die zu transfizierenden Zellen wurden auf einer Zellkulturschale mit 60 mm Durchmesser zu 80%iger Konfluenz wachsen gelassen. 2 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA wurden mit 24 µl steriler 2 M CaCl₂-Lsg. und bidestilliertem Wasser zu 200 µl Gesamtvolumen gebracht. Diese Lösung wurde tropfenweise unter Vortexen zu 200 µl 2 x HBS gegeben. Dieser Mix wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Während der Inkubation wurde das Medium der Zellkulturschale bis auf 1 ml abgezogen, nun wurde tropfenweise der DNA/CaCl₂/HBS-Mix auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 6-18 h in 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre mit dem Transfektionsansatz inkubiert, danach erfolgte ein Mediumwechsel.

2 x HBS:	50 mM HEPES, pH 7.05
	10 mM KCl
	12 mM Dextrose
	280 mM NaCl
	1.5 mM Na ₂ HPO ₄
	pH ad 7.05 +/- 0.05

2.2.1.4 Elektroporation

Die zu transfizierenden Zellen wurden mit PBS⁺ gewaschen, trypsinisiert und 10 Minuten bei 300 x g und 4°C pelletiert. Nach der Gesamtzellzahlbestimmung wurde eine Konzentration von 3 x 10⁷ Zellen pro ml mit Cytomix (van den Hoff et al., 1992) eingestellt.

Anschließend wurden 225 µl Cytomix zu 10 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA in 25 µl Gesamtvolumen Wasser gegeben und 10 Minuten auf Eis in einer vorgekühlten 4 mm Elektroporationsküvette inkubiert. Es folgte ein Elektroschock der Zell-Plasmid-Suspension bei 250 eV Spannung und 975 µF Kapazität, gefolgt von einer 10minütigen Inkubation bei 37°C. Der gesamte Ansatz wurde auf eine neue Zellkulturschale gebracht und unter den üblichen Bedingungen kultiviert.

Cytomix:	10% (v/v) FCS
	2 mM ATP
	5 mM reduziertes Glutathion
	120 mM KCl
	0,15 mM CaCl ₂
	10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 7,6
	25 mM HEPES pH 7,6
	2 mM EGTA pH 7,6
	1 mM MgCl ₂ pH 7,6

2.2.1.5 Sonstige Transfektionsmethoden

Teilweise wurden auch kommerzielle Transfektionsmethoden wie Effectene, Superfect oder Polyfect (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.2 DNA-Arbeitstechniken

2.2.2.1 Plasmidisolierung aus *E. coli* Bakterien (Mini-Präparation)

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien in kleinem Maßstab wurden 5 ml LB-Medium Kulturen mit entsprechendem Selektionsantibiotikum von einzelnen Bakterienklonen bei 37°C und 225 rpm über Nacht angezogen. 1,5 ml Kultur wurden 1 Minute bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, 300 µl S1-Lösung hinzugegeben und resuspendiert. Die Bakterienlyse erfolgte durch Zufügen von 300 µl S2-Lösung und 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Zelluläre Proteine wurden durch Zusatz von 300 µl S3-Lösung und 10minütiger Inkubation auf Eis ausgefällt. Nach Zentrifugation (15 Minuten bei 12000 x g und 4°C) wurde der Überstand mit 630 µl Isopropanol versetzt und 30 Minuten bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol 10 Minuten bei 12000 x g und 4°C gewaschen. Das Pellet wurde bei 37°C getrocknet und anschließend in 50 µl H₂O aufgenommen. Nun konnte die Plasmid-DNA mit Restriktionsanalysen überprüft werden.

LB-Medium:	10 g Pepton
	5 g Hefeextrakt
	170 mM NaCl
	ad 1 l
	pH 7,5 (autoklaviert)
S1-Lösung:	50 mM Tris-HCl
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
	pH 8,0

S2-Lösung:	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
S3-Lösung:	2,8 M Kaliumacetat pH 5,1

2.2.2.2 Plasmidisolierung aus *E. coli* Bakterien (Maxi-Präparation)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien in großem Maßstab wurden 500 ml SB-Medium Kulturen mit entsprechendem Selektionsantibiotikum von einzelnen positiven Mini-Präparationen bei 37°C und 225 rpm über Nacht vermehrt. Die Präparation erfolgte über sog. CsCl-Dichtegradientenzentrifugation. Die gesamte Kultur wurde 10 Minuten bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in GTE-Puffer aufgenommen. Nach 20minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 80 ml Lysepuffer. Die Bakterienlyse erfolgte für 10 Minuten auf Eis, zelluläre Proteine wurden durch Zusatz von 40 ml 3 M Kaliumacetat-Lsg. pH 5,5 und 20minütiger Inkubation auf Eis ausgefällt. Nach Zentrifugation (10 Minuten bei 4000 x g und 4°C) wurde der Überstand durch einen Nucleobond XL Faltenfilter zu 0,6 Volumen Isopropanol gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei RT wurde 15 Minuten bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 30 - 60 Minuten luftgetrocknet und in 7 ml 0,1 x SSC aufgenommen. Das Volumen jeder DNA/0,1 x SSC-Lsg. wurde ermittelt und mit 1,0 g CsCl je ml Lösung versetzt und kräftig geschüttelt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis und einer Zentrifugation (20 Minuten bei 4000 x g und 4°C) wurde der Überstand in ein Beckmann Quick Seal 16 x 76 mm Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Es wurden 200 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, das Zentrifugenröhrchen bis zum Rand mit Mineralöl überschichtet und mit einem Beckmann Quick Sealer verschlossen. Nach 16stündiger Ultrazentrifugation bei 20°C und 55000 rpm im TI 75 Kontron-Rotor wurde die deutlich erkennbare Plasmidbande mit einer 18 Gauge Kanüle abgezogen und das Ethidiumbromid mehrmals mit TE gesättigtem Butanol extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 3fachem Volumen TE und 8fachem Volumen Ethanol versetzt und 30 Minuten bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert.

Das Pellet wurde einmal mit 70% EtOH gewaschen und anschließend bei 65°C getrocknet. Die DNA wurde in 0,1 x SSC aufgenommen und stand nun für weitere Verwendung zur Verfügung.

SB-Medium:	80 g LB-Premix 88 g Trypton 60 g Hefeextract 5 mM Glucose 5 mM NaOH ad 4 l ddH ₂ O
GTE-Puffer:	50 mM Glucose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 5 mg/ml Lysozym

Lysepuffer:	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
20 x SSC Puffer:	3 M NaCl 300 mM Natriumcitrat pH 7,0
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA

2.2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur photometrischen DNA-Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion einer DNA-Lösung bei 260 und 280 nm gemessen.

Folgende Formel liegt der DNA-Konzentrationsbestimmung zugrunde:

$$\text{Konzentration} = 62,9 \times \text{OD}_{260} - 36,0 \times \text{OD}_{280} [\mu\text{g/ml}]$$

2.2.2.4 Elektrophoretische Trennung von DNA

Nukleinsäuren wurden mit Gelladepuffer versetzt und in 0,8 - 2,5%igen (w/v) horizontalen Agarosegelen nach ihrer Größe getrennt. Diese 1 x TAE - Puffer Gele mit 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid wurden bei 10-15 V/cm in 1 x TAE als Laufpuffer betrieben.

Zur Trennung von PCR-Fragmenten wurden vertikale 0,05%ige Polyacrylamidgele in 0,5 x TBE - Puffer verwendet. Die Detektion der Fragmente erfolgte durch UV-Licht Anregung.

50 x TAE Puffer:	2 M Tris-Acetat 50 mM EDTA, pH 8,0 ad 1 l ddH ₂ O
5 x TBE Puffer:	450 mM Borsäure 450 mM Tris-HCl 10 mM EDTA pH 8,0 ad 1 l ddH ₂ O
10 x Gelladepuffer:	50% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol FF

2.2.2.5 Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden generell mit dem QIAquick Gel Extraction Kit oder MiniElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus Agarosegelen eluiert.

2.2.2.6 DNA-Transformation durch Hitzeschock

Chemisch kompetente Bakterien wurden mit 15-100 ng Plasmid-DNA oder 2 μl Ligationsansätzen transformiert. Hierzu wurden 30 μl Bakterien mit der DNA 30 Minuten auf Eis inkubiert bevor der Ansatz einem 30sekündigem Hitzeschock bei 42°C unterzogen wurde. Die Bakterien wurden 2 Minuten auf Eis inkubiert und dann mit 500 μl SOC

Medium 60 Minuten bei 37°C und 225 rpm inkubiert, bevor der Ansatz auf LB-Agar-Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert wurde.

SOC-Medium:	2% (w/v) Pepton
	0,5% (w/v) Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose

2.2.2.7 DNA-Transformation durch Elektroporation

Elektrisch kompetente Bakterien wurden mit 15-100 ng Plasmid-DNA oder 2 µl Ligationsansätzen transformiert. Hierzu wurden 20 µl Bakterien mit der DNA in gekühlten 0,2 mm Elektroporationsküvetten 30 Minuten auf Eis inkubiert und bei 1,7 keV geschockt. Danach wurden 500 µl SOC Medium hinzugegeben und 60 Minuten bei 37°C und 225 rpm inkubiert, bevor der Ansatz auf LB-Agar-Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert wurde.

2.2.2.8 Restriktion von DNA

Nukleinsäuren wurden mit 4 Einheiten Restriktionsenzym pro µg DNA 3 h in entsprechendem Puffer nach Herstellerangaben gespalten. Die Analyse der Fragmente erfolgte durch Agarosegele (2.2.2.4).

2.2.2.9 Auffüllen und Verdau von 5' bzw. 3'-überhängenden Enden

Sog. 5'-überhängende '*sticky ends*' von Nukleinsäuren wurden mit der Klenow Polymerase-Einheit aufgefüllt. Hierzu wurden 2 Einheiten Klenow (Roche, Mannheim) und 10 µM dNTP mit DNA in Klenow-Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

3'-überhängende Enden dagegen wurden mit der Mungbohnen Nuklease (New England Biolabs, Frankfurt) abgedaut und in glatte '*blunt ends*' umgewandelt. Hierzu wurden 10 Einheiten Nuklease in entsprechendem Puffer in einem 10 µl Gesamtansatz nach Herstellerangaben inkubiert.

10 x Klenow-Puffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 7,6
	0,1 M MgCl ₂

2.2.2.10 DNA-Dephosphorylierung

Zur Unterdrückung sog. Religationen wurden 5'-Phosphatgruppen von linearisierten Klonierungsplasmiden durch Phosphatase-Reaktionen abgetrennt. Hierzu wurde linearisierte und aufgereinigte Plasmid-DNA mit 4 Einheiten alkalischer Phosphatase (Promega, Mannheim) in entsprechendem Puffer in einem Gesamtvolumen von 40 µl 120 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.2.2.11 Ligation von DNA

DNA-Fragmente wurden in vorher linearisierte Plasmidvektoren eingebracht, indem 9-90 fmol DNA-'Insert' mit 3-30 fmol dephosphoryliertem und linearisiertem Plasmidvektor ligiert wurden. Hierbei wurden die Fragmente mit 1 Einheit T4-DNA Ligase (Invitrogen, Groningen, NL) und entsprechendem Puffer in 10 µl Gesamtansatz bei 16°C über Nacht inkubiert.

Zur Klonierung von PCR Fragmenten in den pCR2.1-TOPO Vektor wurde das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, NL) nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.2.12 DNA-Amplifikation

Die Amplifikation von DNA mit sequenzspezifischen Primern erfolgte mittels der sog. '*polymerase chain reaction*' (PCR) (Mullis et al., 1986).

Ein typischer Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 ng DNA '*template*' oder 2 µl reverse transkribierte cDNA
 0,2 µM je Primer
 0,2 mM dNTP Mix
 1 - 5 U Polymerase

Plus die entsprechende Menge 10 x Puffer in Ampuwa-PCR-Wasser (Fresenius, Bad Homburg). Bei semi-quantitativen radioaktiv markierten PCRs wurden zudem noch 0,3 nmol $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP eingesetzt.

Die Schmelztemperatur der jeweiligen Primer wurde wie folgt berechnet:

$$T_M = 69.3^\circ\text{C} + 0.41 \times (\text{GC-Gehalt}) - 650 / L \quad (= \text{Primerlänge})$$

Die Ansätze wurden in einer sog. '*touchdown*' PCR mit einem '*hot start*' (D'aquila et al., 1991) unter Verwendung der Hot-Start Master Taq Polymerase (Eppendorf, Hamburg) nach folgendem Programm amplifiziert:

95°C,	300 Sek.	
95°C ,	15 Sek.	} 10 Zyklen je -0.5°C beim ' <i>annealing</i> '
$T_M + 2^\circ\text{C}$,	30 Sek.	
70°C,	60 Sek.	
95°C ,	15 Sek.	} 10-25 Zyklen je nach Amplifikat
$T_M - 3^\circ\text{C}$,	30 Sek.	
70°C,	60 Sek.	
70°C,	120 Sek.	

Der Erfolg einer PCR wurde durch Agarose- bzw. bei semi-quantitativen PCRs durch Polyacrylamidgelelektrophorese kontrolliert (2.2.2.4).

Radioaktiv markierte PCRs wurden nach erfolgreicher Polyacrylamidgelelektrophorese auf einem Gelrockner getrocknet und anschließend wurde zur Autoradiographie in einer Biomax MS Röntgenfilmkassette ein Kodak Biomax Film exponiert.

Zur Amplifikation von Gen- bzw. Promotorfragmenten wurde in einer sog. '*high fidelity*' PCR-Reaktion mit der Triple Master Taq Polymerase (Eppendorf, Hamburg) nach Herstellerangaben ein DNA-Fragment erzeugt und das Amplifikat in den pCR2.1-TOPO TA Vektor kloniert (vgl. 2.2.2.11).

2.2.2.13 Zielgerichtete DNA-Mutagenese

Zur Einführung bzw. Behebung von Mutationen in DNA Sequenzen wurde das QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) mit HPLC-aufgereinigten spezifischen Oligonukleotiden nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.3 RNA-Arbeitstechniken

2.2.3.1 RNA-Präparation

Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) aus zuvor pelletierten Zellen nach Herstellerangaben extrahiert. Die Qualität dieser RNA wurden sowohl elektrophoretisch (2.2.2.4), als auch photometrisch (2.2.3.2) bestimmt.

Zur Aufreinigung von polyadenylierten mRNAs aus Gesamt-RNA wurde das Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.3.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration von verdünnten Lösungen wurde durch Messen der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Hierbei lag der Konzentrationsbestimmung folgende Formel zugrunde:

$$\text{RNA Konzentration} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \text{ } [\mu\text{g/ml}]$$

2.2.3.3 Reverse Transkription

Zur Generierung von komplementärer cDNA aus Gesamt-RNA wurde das Omniscript RT-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. 1 µg Gesamt-RNA wurde mit 1 µM oligo-dT (Applied Biosystems, Darmstadt), 1 mM dNTP, 40 Einheiten RNase Inhibitor (Promega, Mannheim) und 4 Einheiten Reverser Transkriptase (Qiagen, Hilden) in entsprechendem Puffer und einem Gesamtvolumen von 20 µl 60 Minuten bei 37°C nach Herstellerangaben inkubiert. Das Enzym wurde 5 Minuten bei 95°C inaktiviert, der Ansatz wurde abgekühlt und mit 30 µl Ampuwa-PCR-Wasser versetzt. Die cDNA stand nun für weitere Analysen z.B. für die PCR (vgl. 2.2.2.12) zur Verfügung.

2.2.4 Protein-Arbeitstechniken

2.2.4.1 Gesamtzellextrakt-Generierung

Zur Herstellung von Gesamtproteinzellextrakten wurden Zellen durch Abschaben und anschließende Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 x g und 4°C pelletiert. Abhängig von der Zellzahl wurde das Pellet in 50-300 µl RIPA-Puffer resuspendiert, 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann 15 Minuten bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Der von Zelltrümmern gereinigte Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

RIPA-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 7,2
	150 mM NaCl
	0,1% (w/v) SDS
	1% (w/v) Na-Desoxycholat
	1% (v/v) Triton X-100

2.2.4.2 Protein-Konzentrationsbestimmungen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Gesamtzellextrakten wurde der Bio-Rad Protein-Assay (BioRad, München) verwendet. 1 µl Gesamtzellextrakt wurden mit 99 µl PBS⁻, 700 µl H₂O und 200 µl Bio-Rad Protein-Assay bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer vermessen. Anhand einer BSA-Eichkurve bekannter Proteinkonzentrationen wurde die Proteinkonzentration in µg/µl ermittelt.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen wurde durch die sog. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter reduzierten Bedingungen im diskontinuierlichen System durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Acrylamidkonzentration der verwendeten Trenngele lag bei 6-15% mit jeweils 4%igem Sammelgel. Es wurden je 30-750 µg Gesamtproteinextrakt pro Gelspur eingesetzt, die zuvor mit SDS-Gelladepuffer 5 Minuten bei 95°C denaturiert wurden. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurde das PROTEAN III-System (Bio-Rad, München) in 1 x SDS-Laufpuffer verwendet.

5 x SDS-Laufpuffer:	125 mM Tris
	125 mM Glycin
	0,5% (w/v) SDS
SDS-Gelladepuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 6,8
	100 mM Dithiothreitol
	2% (w/v) SDS
	0,1% (w/v) Bromphenolblau
	10% (v/v) Glycerin

2.2.4.4 Western Blotting

Nach erfolgreicher Trennung wurden die Proteine auf eine Hybond-ECL Nitrocellulose-membran (Amersham-Biosciences, Freiburg) übertragen. Hierzu wurde das 'semi-dry blotting' Verfahren in einer Trans Blot SD Zelle (Bio-Rad, München) angewendet. Der

Transfer erfolgte, nachdem die Membran zuvor in Blotpuffer äquilibriert wurde, bei 1,5 mA/cm² Membranfläche für 30-120 Minuten.

5 x Blotpuffer:	970 mM Glycin
	125 mM Tris/HCl pH 8,3

2.2.4.5 Immundetektion

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Elektrotransfer 1 h bei RT in 10% (w/v) Milchpulver in 0,1% (v/v) Tween-20 TBS-Puffer blockiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgte in Verdünnungen von 1:100 bis 1:5000 des Antikörpers in 5% (w/v) Milchpulver in 0,1% (v/v) Tween-20 TBS-Puffer über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken der Membran. Die Membran wurde dreimal in 0,1% (v/v) Tween-20 TBS-Puffer gewaschen, bevor sie mit dem '*horse radish peroxidase*' (HRP) gekoppelten Zweitantikörper nach Herstellerangaben in 5% (w/v) Milchpulver in 0,1% (v/v) Tween-20 TBS-Puffer 1 h bei RT unter ständigem Schwenken inkubiert wurde. Die Membran wurde erneut dreimal in 0,1% (v/v) Tween-20 TBS-Puffer gewaschen, bevor das Super-Signal Dura West Extended Kit (Pierce, Bonn) zur Detektion der Chemilumineszenz nach Herstellerangaben eingesetzt wurde. Mit der Membran wurde schließlich ein X-Omat Kodak Röntgenfilm exponiert.

10 x TBS-Puffer:	200 mM Tris
	1,35 M NaCl

2.2.4.6 *in vitro* Translation

Je 0,5 µg Plasmid-DNA von vollängenklonierten Genen wurden von der T7 Primer-Bindungsstelle unter Verwendung von ³⁵S-Methionin mit dem TNT T7 Quick coupled Transcription/Translation System (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben *in vitro* translatiert. Anschließend wurde ein 10 µl Aliquot durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Trocknen des Gels autoradiographisch ausgewertet.

2.2.5 Mikroarraytechnologie

2.2.5.1 Herstellung von DNA-Hybridisierungssonden

Aus polyadenylierter mRNA wurde mit dem Strip-EZ RT Kit (Ambion, Austin, TX, USA) nach Herstellerangaben ³³P-dATP-markierte cDNA generiert. Ein Aliquot dieser Hybridisierungssonde wurde im Tri-Carb 2100 TR Szintillationszähler (Canberra-Packard, Dreieich) vermessen und dann für die Hybridisierung eingesetzt.

2.2.5.2 Hybridisierung

Zwei identische Human LifeGrid 1.0 Nylon Membranen (Incyte Genomics, Heidelberg) wurden nach Herstellerangaben mit der jeweiligen cDNA Sonde (vgl. 2.2.5.1) über Nacht bei 68°C im Hybridisierungssofen unter ständigem Schwenken hybridisiert. Durch mehrmaliges Waschen der Membran in 2 x SSC / 0,1% (w/v) SDS bis 0,1 x SSC /

0,1% (w/v) SDS bei Temperaturen von 25°C bis 68°C für jeweils 10 Minuten nach Herstellerangaben wurden unspezifische Adsorbate an die Membran heruntergewaschen. Die Membranen wurden in Klarsichtfolie gelegt und waren nun für die Auswertung verwendbar.

2.2.5.3 Detektion und Auswertung

Die gewaschenen Membranen wurden unter Phosphorimagerplatten für 3 bis 16 h bei -80°C exponiert und die hieraus resultierenden Bilder wurden auf dem Phosphorimager Fujifilm BAS-1500 Scanner generiert. Die Analyse und Auswertung der zu vergleichenden Bilder wurde von Incyte Genomics mit deren ArrayVision Software durchgeführt.

2.2.6 Adenovirale Arbeitstechniken

2.2.6.1 AdEasy-Technologie

Adenovirale Vektoren wurden mit Hilfe des sog. AdEasy Systems hergestellt (He et al., 1998). Dabei wurden Fremdgene in den AdTrack-CMV 'Shuttle' Vektor kloniert und dieser anschließend mit dem pAdEasy1 Plasmid rekombiniert. Das pAdEasy1 Plasmid enthält das Ad5 Genom mit Deletionen der E1 und E3 Regionen; daher entstehen durch Rekombination dieses Vektors mit dem 'Shuttle' Plasmid durch homologe Bereiche in beiden Plasmiden replikationsdefiziente Adenoviren. Die Rekombination der Vektoren wurde in *E. coli* BJ 5183 Bakterien durchgeführt und das resultierende adenovirale Konstrukt nach Linearisierung durch Transfektion in HEK 293 Zellen propagiert.

Die Bestandteile dieses Systems wurden unserer Arbeitsgruppe von B. Vogelstein, Baltimore, MD, USA zur Verfügung gestellt.

2.2.6.2 Klonierung und Generierung adenoviraler Vektoren

Zur Generierung von Ad.CMV.KIAA0455, Ad.CMV.KIAA0717, Ad.CMV.KIAA0767/Dip und Ad.CMV.KIAA0767Dip His tag wurde das entsprechende Gen mit sequenzspezifischen Primern unter Ausschluß des jeweiligen Terminationscodons in einer PCR-Reaktion in Volllänge amplifiziert und in den pCR2.1 TOPO Vektor eingebracht. Für die Herstellung von Ad.CMV.KIAA0767/Dip His tag wurde die Vollängen-cDNA in den pCDNA 3.1/ myc-His zwischenkloniert, um das His-tag Signal anzuhängen. In einem gerichteten Klonierungsschritt wurde das jeweilige Gen in den pAdTrack.CMV 'Shuttle'-Vektor eingebracht und schließlich in *E. coli* BJ 5183 Bakterien mit dem pAdEasy1 Plasmid rekombiniert. Ein typischer Rekombinationsansatz setzte sich aus 1,5 µg Pme I linearisiertem pAdTrack.CMV Vektor, 100 ng pAdEasy1 und 20 µl elektrokompenten BJ 5183 Bakterien zusammen (vgl. He et al., 1998). Nach Überprüfung von Rekombinationsklonen wurde die Plasmid-DNA in XL₂-Blue Bakterien retransformiert, mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und nach Linearisierung in HEK 293 Zellen transfiziert. In diesen Zellen werden die deletierten Genprodukte der Ad5 E1

Region zur Verfügung gestellt; somit wurde die Erzeugung von Adenoviren ermöglicht. Eine solche erste infektiöse Platte HEK 293 Zellen wurde nach 10 Tagen abgeschabt und zusammen mit dem Überstand durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C im Wasserbad 'lysiert'. Zur Generierung sog. '*high titer*' wurden acht Zellkulturschalen mit 150 mm Durchmesser mit diesem 'lysierten' Überstand infiziert und nach 2-3 Tagen vereinigt, wenn ein zytopathischer Effekt entstanden war. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4°C und 300 x g wurde das Pellet in 4 ml PBS^{+/+} 10% Glycerin (v/v) resuspendiert und dreimal zur Freisetzung der viralen Partikel wie zuvor 'lysiert'. Dieser '*high titer*' wurde für weitere *in vitro* Experimente bei -80°C gelagert.

2.2.6.3 Titration adenoviraler Vektoren

Zur Titerbestimmung von Adenoviren wurde die in Zellkultur infektiöse Dosis 50 (TCID₅₀) Methode durchgeführt. Hierzu wurden 96-Loch Zellkulturplatten im Doppelansatz mit je 10⁴ HEK 293 Zellen pro Loch ausgesät. Nach 16 h wurden Virusverdünnungen von 10⁻⁵ bis 10⁻¹² in 10fach Bestimmung zu den Zellen gegeben. Nach 10tägiger Inkubation wurde der zytopathische Effekt (CPE) in den Kavitäten gezählt und der Titer jeder Platte mit der statistischen KÄRBER-Methode berechnet:

$$T = 10^{1+d(S-0,5)} [\text{TCID}_{50}/\text{ml}]$$

Hierbei entspricht d dem log 10 der Verdünnung (d=1 für eine 10fach Verdünnung). S ist die Summe aller Verhältnisse, wobei immer bei der ersten Verdünnung (=10⁻¹) begonnen wird, auch wenn nur höhere Verdünnungen als 10⁻¹ verwendet wurden.

TCID₅₀/ml wurde in PFU/ml umgerechnet durch eine Korrektur von 0,7 log:

$$10^x \text{ TCID}_{50}/\text{ml} = 10^{x-0,7} \text{ PFU/ml}$$

2.2.6.4 Adenovirale Infektion von Zellen

Zur effizienten Transduktion einer definierten Anzahl Zellen wurde das Medium von der Zellkulturplatte abgezogen. Die entsprechende Virusmenge wurde in 20% Endvolumen Medium auf die Zellen gegeben und 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das restliche Volumen (80%) Medium wurde hinzugefügt und die Zellen wurden bis zum gewünschten Zeitpunkt inkubiert. Bei jeder Infektion wurde die für die Zelllinie entsprechende Infektionsmultiplizität (moi) verwendet, bei der alle Zellen eine 100%ige Transduktion des Transgens aufweisen.

2.2.7 Zytotoxizitäts- und Apoptoseanalyseverfahren

2.2.7.1 MTT-Assay

Zur Bestimmung des Einflusses der Überexpression vollängenklonierter Gene auf die Zellvitalität verschiedener Zellen wurde auf 96-Loch Zellkulturplatten eine definierte Zellzahlen mit adenoviralen Vektoren von KIAA0455, KIAA0717 und KIAA0767/Dip in 3fach Bestimmung infiziert. Als Positiv- und Negativkontrollen dienten Adenoviren, die das pro-apoptotische p53 in Wildtyp bzw. das grünfluoreszierende Protein (GFP) exprimierten. Über einen Zeitraum von 4 Tagen wurde alle 24 h die Zellvitalität mit dem CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben gemessen.

2.2.7.2 Durchflusszytometrische DNA-Gehaltsbestimmung

Zur Analyse apoptotischer Zellen wurde die Detektion von fragmentierter DNA im Durchflusszytometer (FACS) (Ormerod, 1998) gemessen. 10^6 H1299 Zellen wurden mit Ad.CMV.KIAA0717, Ad.CMV.KIAA0767/Dip, Ad.CMV.GFP oder Ad.CMV.p53wt infiziert. Alle 24 h über 4 Tage wurden die Zellen mit Trypsin von der Zellkulturschale gelöst und mit dem Mediumüberstand 10 Minuten bei 4°C und 300 x g pelletiert. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen, das Pellet in 500 µl PBS⁻ aufgenommen und in 5 ml eiskaltem 70% (v/v) Ethanol unter Vortexen fixiert und bei -20°C aufbewahrt. Die fixierten Zellen wurden nach Zentrifugation (10 Minuten bei 4°C und 500 x g) einmal mit PBS⁻ gewaschen und in 2 ml Propidium-Iodid-PBS⁻-Lösung aufgenommen. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen im FACS Vantage Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) mit der CellQuest Software analysiert und ausgewertet.

Propidium-Iodid-	
Lösung:	100 µg/ml Propidium-Iodid
	100 µg/ml RNase A
	in PBS ⁻

2.2.7.3 Kernfärbung apoptotischer Zellen

Um morphologische Veränderung von pro-apoptotischen Zellen wie z.B. Zellschrumpfung oder Aufblähen zellulärer Membranen zu identifizieren wurden 2×10^5 H1299 Zellen mit Ad.CMV.KIAA0717, Ad.CMV.KIAA0767/Dip, Ad.CMV.GFP oder Ad.CMV.p53wt infiziert. Alle 24 h über 4 Tage wurden die Zellen mit 5 µg/ml Hoechst 33342 und 5 µg/ml Propidium-Iodid durch 15 Minuten Inkubation bei 37°C gefärbt und anschließend im konfokalen Laser Scan Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Oberkochen) analysiert.

2.2.7.4 Detektion von nukleosomalen DNA-Fragmenten

Die Detektion von nukleosomalen DNA-Fragmenten wurde durch die Infektion von $1,5 \times 10^6$ H1299 Zellen mit Ad.CMV.KIAA0767/Dip, Ad.CMV.GFP oder Ad.CMV.p53wt eröffnet. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen nach Trypsinbehandlung zusammen mit dem Medium 10 Minuten bei 300 x g und 4°C gesammelt, in 200 µl Fragmentierungspuffer resuspendiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 µg RNase A hinzugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert. Durch zweifache Phenol-Chloroform Extraktion wurde die DNA aufgereinigt und mit 2,5 Volumen Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 präzipitiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Die DNA wurde durch 15minütige Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C pelletiert, in 40 µl TE-Puffer (vgl. 2.2.2.2) resuspendiert und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.2.4).

Fragmentierungs-	
puffer:	50 mM Tris/HCl pH7,8
	10 mM EDTA pH 8,0
	1% (w/v) SDS
	0,5 mg/ml Proteinase K

2.2.8 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur subzellulären Lokalisation des KIAA0767/Dip Proteins wurden H1299 Zellen durch Elektroporation mit pCDNA 3.1/ myc-His Kontrollplasmid oder pCDNA 3.1/ myc-His. KIAA0767/Dip transfiziert, auf Deckgläschen ausgesät und unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. 24 h nach Elektroporation wurden die Zellen 15 Minuten bei 37°C in 3,7% (v/v) Formaldehyd fixiert und 5 Minuten bei RT mit 0,2% (v/v) Triton X-100 PBS⁼ permeabilisiert. His markiertes KIAA0767/Dip wurde detektiert, indem die Zellen 1 h bei RT mit anti-His Primärantikörpern (Invitrogen, Groningen, NL) in 1:500 Verdünnung in 1% (w/v) BSA in PBS⁼ inkubiert wurden. Der murine Erstantikörper wurde durch Alexa Fluor 546 gekoppelte anti-Maus Sekundärantikörper (Molecular Probes, Leiden, NL) in 1:300 Verdünnung in 1% (w/v) BSA in PBS⁼ detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI-Lösung für 15 Minuten bei RT gefärbt. Durch Inkubation mit MitoTracker-Lösung (Molecular Probes, Leiden, NL) für 30 Minuten bei RT wurden die Mitochondrien gefärbt. Nach jeder Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS⁼ gewaschen. Die Analyse der fixierten Zellen erfolgte im konfokalen Laser Scan Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Oberkochen).

DAPI-Lösung:	10 mg/ml 4',6'-Diamidino-2-phenyl-indol Dilactat in H ₂ O
MitoTracker-Lösung:	200 nM MitoTracker Green FM in PBS ⁼

2.2.9 Reporterogenanalyse

Zur Analyse eines möglichen KIAA0767/Dip-Promotors und dessen Aktivierung durch E2F1-Expression wurde der Bac Klon # RPCI-3-439F8 von BACPAC Resources, Oakland, CA, USA verwendet. In einer Einschnitt '*high fidelity*' PCR-Reaktion wurde mit den sequenzspezifischen Primern 'Promotor sense' und 'Promotor antisense' (vgl. 2.1.6) ein 7,8 kB Promotorfragment amplifiziert und in den PCR2.1-TOPO Vektor eingebracht. Ausgehend von diesem Konstrukt wurden außerdem drei weitere Promotorkonstrukte mit den Primern +358-Promotor/-21Promotor, +206Promotor/-21Promotor und +98 Promotor/-21 Promotor durch '*high fidelity*' PCR-Reaktionen amplifiziert und ebenfalls in den pCR 2.1-TOPO Vektor kloniert. Nach Sequenzierung der Konstrukte wurden diese Promotorfragmente durch gerichtete Klonierungen in den promotorlosen pGL3-Basic Vektor (Promega, Mannheim) kloniert. H1299 und Saos-2 Zellen wurden durch Elektroporation mit je 1 µg pGL3-Promotorkonstrukt bzw. pGL3-Basic als Negativkontrolle und 3 µg pCMV.E2F1 transfiziert. 48 h nach Elektroporation wurden Zellen geerntet, mit dem Luciferase Reporter Assay System (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben Zellextrakte generiert und im Luminometer Lumat LB 9501 (Berthold, Wildbad) auf ihre Luciferaseaktivität hin analysiert.

2.2.10 siRNA-Technologie

Zur Unterdrückung der spezifischen Genexpression von KIAA0767/Dip durch '*small interfering*' RNAs (siRNAs) wurden Oligonukleotide synthetisiert (vgl. 2.1.6). Mit dem GeneSuppressor System (Biocarta, Hamburg) wurden diese Oligos in den 'Shuttle' Vektor pSuppressorAdeno eingebracht und anschließend nach Rekombination mit Ad5 Plasmiden adenovirale Vektoren hergestellt. Alle hierbei angewendeten Methoden der Klonierung, Verifizierung, Rekombination, Propagierung der Viruspartikel und Titration wurden nach Herstellerangaben ausgeführt.

2.2.11 Zellkompartimentfraktionierung

Zur Fraktionierung von verschiedenen Zellkompartimenten wurde das ApoAlert Kit (BD Clontech, Heidelberg) angewendet. $2,5 \times 10^7$ H1299 Zellen wurden adenoviral mit Ad.CMV.ER-E2F1 oder in Kombination mit Ad.CMV.ER-E2F1/Ad.siGFP oder Ad.CMV.ER-E2F1/Ad.siDip infiziert. 24 h nach Infektion wurde die ER-E2F1-Aktivität mit 1 µM 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) induziert, die Zellen zum gewünschten Zeitpunkt geerntet und nach Herstellerangaben in Proteinextrakte der cytosolischen und mitochondrialen Fraktion getrennt. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (vgl. 2.2.4.2) und ein Aliquot für SDS-PAGE eingesetzt.

2.2.12 Colony Assay

Die Unterdrückung der KIAA0767/Dip-Expression und deren Einfluß auf die E2F1-vermittelte Apoptose wurde durch das Ermitteln von überlebenden Zellkolonien überprüft. H1299 ER-E2F1-Zellen wurden mit Ad.siDip und Ad.siGFP infiziert, 24 h nach Infektion mit 4-OHT induziert und nach 7 Tagen mit frischem 4-OHT-Medium versetzt. 2 Wochen nach der Infektion wurden die Zellen einmal mit PBS⁺ gewaschen, mit 4°C kaltem Methanol/Essigsäure (1:1) (v/v) fixiert und getrocknet. Die überlebenden Zellkolonien wurden mit einer 1:20 verdünnten Giemsa-Färbelösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) sichtbar gemacht und ausgezählt.

3 ERGEBNISSE

3.1 E2F1 reguliert Gene verschiedenster zellulärer Funktion

Die zelluläre Homöostase wird durch das Schlüsselprotein E2F1 entscheidend beeinflusst. Dabei werden unter anderem die Differenzierung, die Proliferation und der programmierte Zelltod reguliert.

Mehrere Studien haben gezeigt, daß es unter deregulierten Bedingungen des zellulären Gleichgewichtes zur Induktion von Apoptose kommt, die auch durch den zellulären Transkriptionsfaktor E2F1 induziert wird (Qin et al., 1994; Kowalik et al., 1995; DeGregori et al., 1997). Die E2F1-induzierte Apoptose wird wesentlich durch das Tumorsuppressorprotein p53 vermittelt, wobei auch p53-unabhängige Signalwege existieren. Da die molekularen Prozesse auf dem p53-unabhängigen Weg bisher nur unzureichend aufgeklärt sind, trägt die Identifizierung der hier beteiligten Faktoren maßgeblich zum Verständnis der apoptotischen Signalwege bei.

3.1.1 Herstellung und Charakterisierung von E2F1-regulierbaren Zelllinien

Zur Auffindung von E2F1-regulierten Zielgenen (*'targets'*) wurde ein System kreiert, in dem die E2F1-Aktivität kontrollierbar ist. Zur Regulation der E2F1 Protein-Aktivität wurde das murine Östrogenrezeptor-System verwendet. Hierbei wurde eine transkriptionell inaktive Form der Ligandenbindungsdomäne des murinen Östrogenrezeptors (ER) an das Wildtyp E2F1-Protein fusioniert. Dieses chimere ER-Fusionsprotein soll nach Zugabe des synthetischen Liganden 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) zum Zellkern translozieren (Littlewood et al., 1995). Als nukleärer Transkriptionsfaktor kontrolliert E2F1 die Transkription im Zellkern. Durch die Translokation wird die Transkription von E2F1-regulierten Genen im Nukleus initiiert (Abb. 3.1). Für dieses System wurden p53-negative Zelllinien verwendet, die das ER-E2F1-Fusionsprotein stabil exprimieren. Hierzu wurde eine Saos-2 Zelllinie, die mit einem ER-E2F1-exprimierenden Retrovirus infiziert wurde, die sog. Saos-2 ER-E2F1-Linie, verwendet.

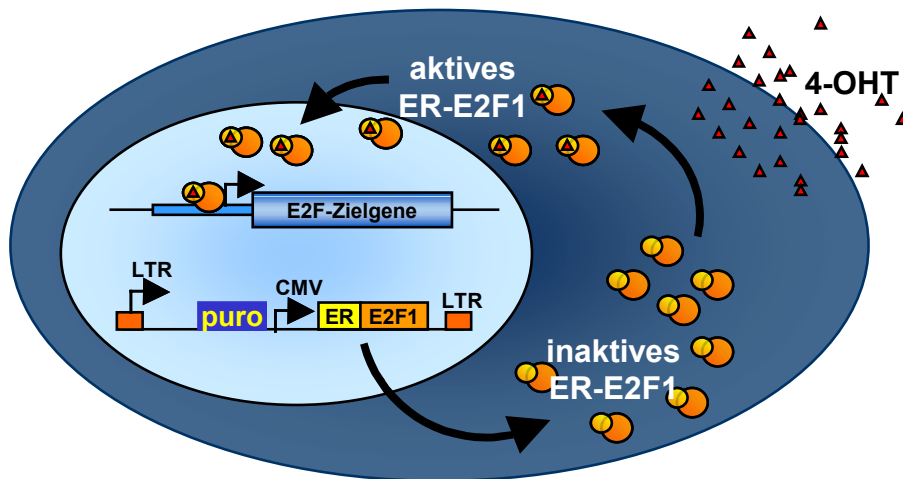
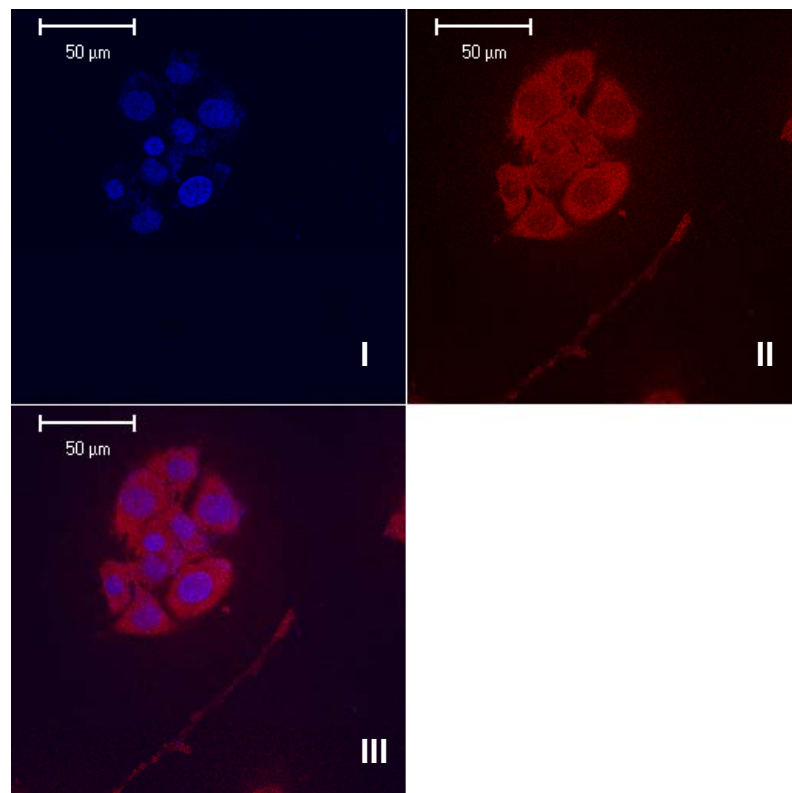


Abb. 3.1 ER-E2F1 Translokationsmodell. Das Fusionsprotein wird im Zellkern transkribiert und ist nach Ausschleusung des Proteins im Cytoplasma lokalisiert. Durch 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) Zugabe transloziert es in den Zellkern und so aktiviertes E2F1 reguliert die Transkription von E2F Zielgenen. Durch Puromycin Selektion überleben nur Zellen, die das Fusionsprotein exprimieren.

Diese Zelllinie ist in der Arbeitsgruppe im Rahmen früherer Projekte hergestellt und beschrieben worden (Stiewe und Pützer, 2000; Stanelle et al., 2002).

Um über eine Zelllinie mit kürzerer Generationszeit zu verfügen, wurden H1299 Zellen durch Elektroporation mit dem pBabeHA-ER-E2F1-Plasmid transfiziert und mit Puromycin auf ER-E2F1-exprimierende Zellen selektiert. Anschließend wurde die ER-E2F1-Expression von einzelnen Zellklonen und die Induzierbarkeit beider Zelllinien überprüft.



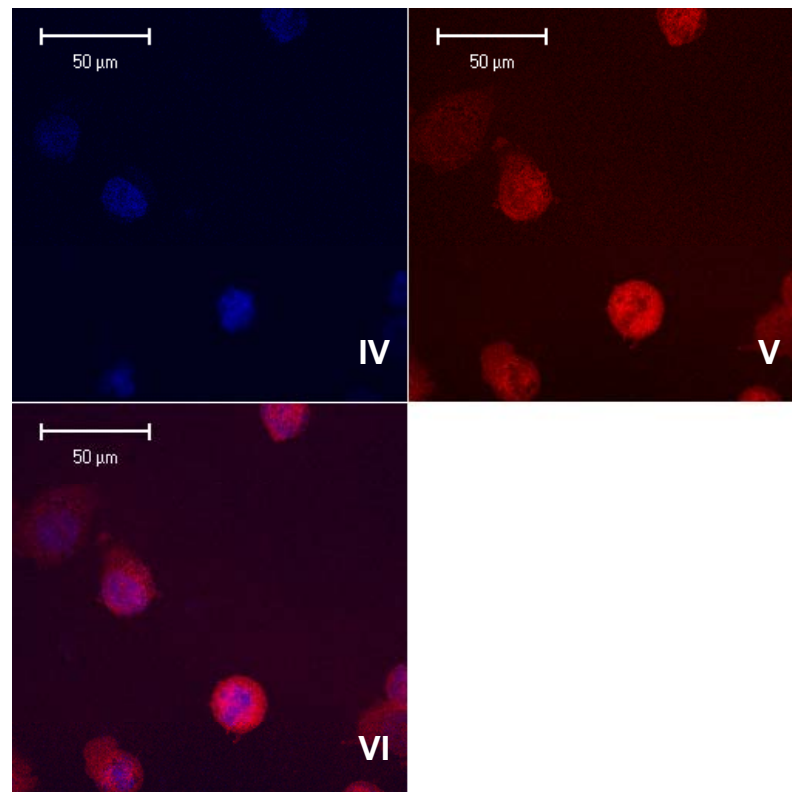
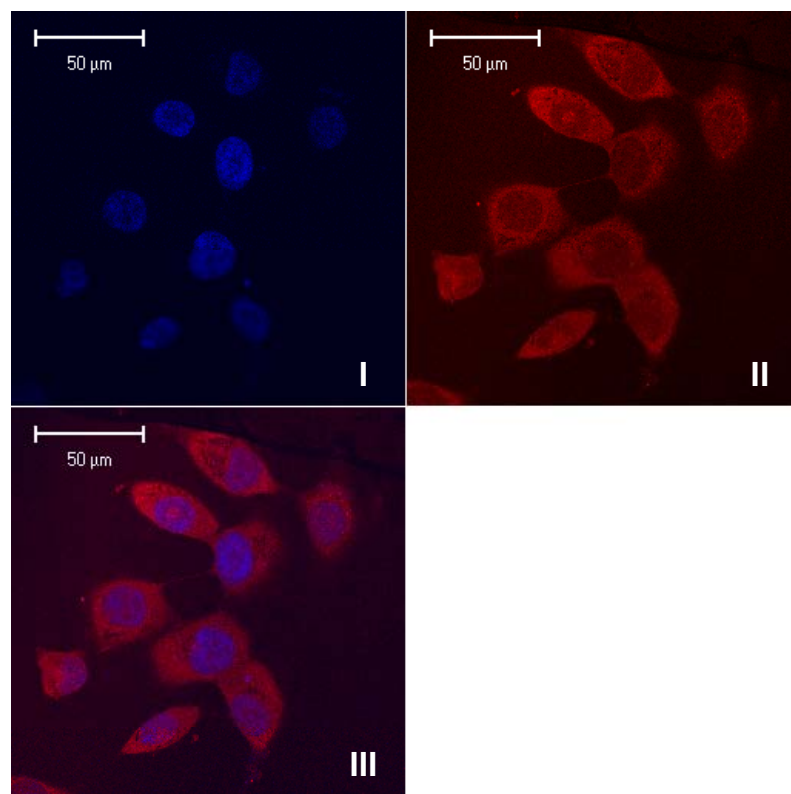


Abb. 3.2 Translokation von ER-E2F1 in Saos-2 ER-E2F1-Zellen. 24 h nach 4-OHT Administration transloziert ER-E2F1 in den Zellkern, IV-VI. Unbehandelte Zellen I-III. I & IV, DAPI-Kernfärbung; II & V, HA-ER-E2F1 Proteindetektion; III & VI, Überlagerungsbild. Ausschnitt repräsentativer Zellen. 63fache Vergrößerung.



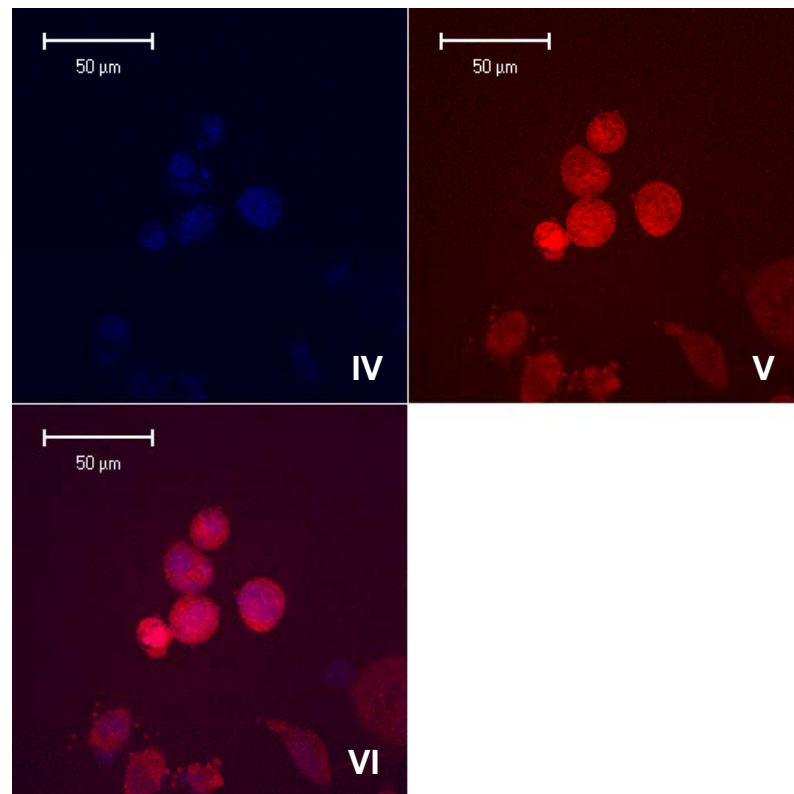


Abb. 3.3 Translokation von ER-E2F1 in H1299 ER-E2F1-Zellen. 24 h nach 4-OHT Administration transloziert ER-E2F1 in den Zellkern, IV-VI. Unbehandelte Zellen I-III. I & IV, DAPI-Kernfärbung; II & V, HA-ER-E2F1 Proteindetektion; III & VI, Überlagerungsbild. Ausschnitt repräsentativer Zellen. 63fache Vergrößerung.

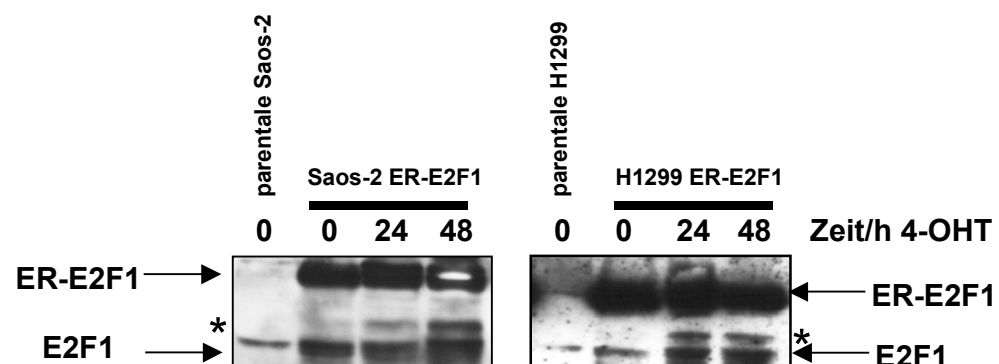


Abb. 3.4 Expression von endogenem und exogenem E2F1. SDS-PAGE mit gleichen Proteinmengen von parentalen und modifizierten H1299 und Saos-2 Zellen. Endogenes E2F1 und exogenes ER-E2F1 wurden durch anti-E2F1 Antikörper dargestellt. *, unspezifische Bande.

Die Translokation des künstlichen Proteins (Abb. 3.2 & Abb. 3.3) konnte durch 4-OHT-Gabe korrekt gesteuert werden. Das ER-E2F1-Protein war nur in transfizierten Zellen detektierbar (Abb. 3.4). Dennoch waren die Proteinlevel des Fusionsproteins und des endogenen E2F1s in modifizierten Zellen etwa gleich.

Durch deutliche Aktivierung von E2F1 wird das zelluläre Gleichgewicht gestört, da die streng regulierte Aktivität des Transkriptionsfaktors plötzlich in einen deregulierten Zustand versetzt wird, und es unter anderem zur Einleitung von Apoptose kommt (DeGregori et al., 1997). Die Transaktivierung von typischen Zielgenen durch E2F1-

Aktivierung und die Apoptoseinduktion wurden mittels RT-PCR und Western Blot überprüft.

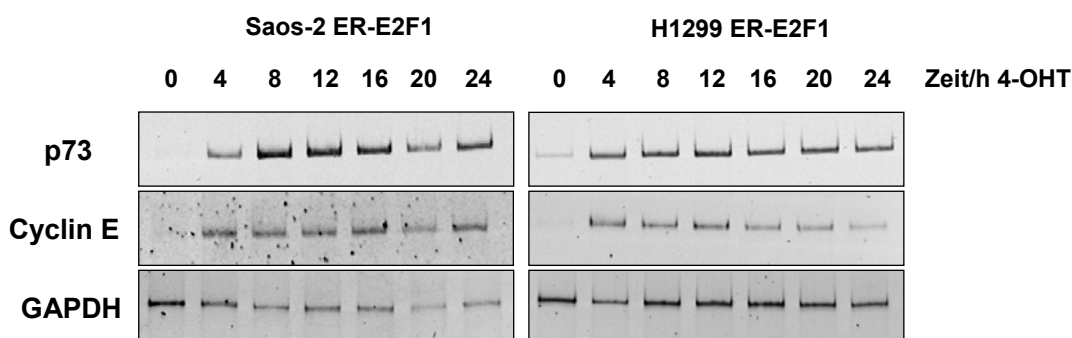


Abb. 3.5 Aktivierung typischer E2F1 Zielgene. RT-PCR an RNA aus H1299 ER-E2F1- und Saos-2 ER-E2F1-Zellen, die 24 h unter Serumentzug gehalten wurden und in denen die Aktivität des exogenen E2F1 durch 4-OHT Gabe angeschaltet wurde.

Die mRNA-Expression typischer E2F1-responsiver Gene wie p73 und Cyclin E (Positivkontrollen) in beiden Zelllinien entsprach den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Ohtani et al., 1995; Stiewe und Pützer, 2000; Müller et al., 2001). Maximallevel wurden nach 8 h erreicht.

Die E2F1-Überexpression führt zur Induktion von Apoptose. Die Todessignalkaskade wird durch die Aktivierung von Caspase-9, -3, und -6 angeschaltet (Rathmell und Thompson, 1999). Die Spaltung dieser Cystein-Proteasen führt schließlich zur Spaltung von zellulären Substraten wie Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) und endet mit der Fragmentierung von DNA in nukleosomale Einheiten. Die PARP-Spaltung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

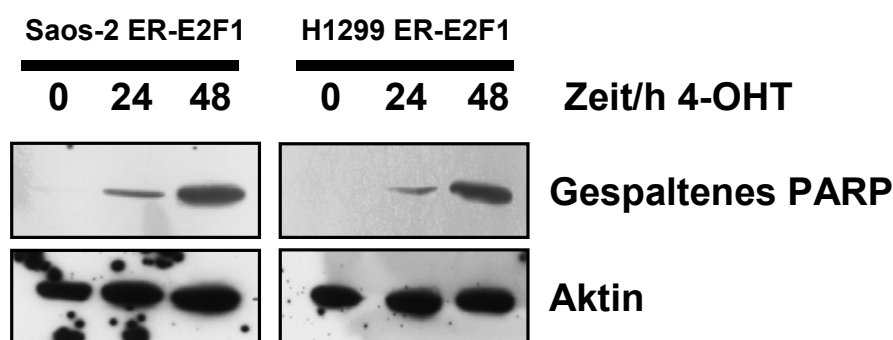


Abb. 3.6 Aktivierung der Todessignalkaskade durch E2F1-Aktivierung. SDS-PAGE an Zellextrakten von H1299 ER-E2F1- und Saos-2 ER-E2F1-Zellen 0, 24 und 48 h nach 4-OHT-Gabe. Das Spaltprodukt (cleaved PARP) der Poly-(ADP-Ribose) Polymerase wurde mit dem anti-cleaved PARP Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde die gleiche Menge Zellextrakt im Western Blot mit anti-Aktin Antikörper analysiert.

Die induzierbare ER-E2F1-Zelllinie ist funktionell, da das Fusionsprotein in ausreichender Menge in den Zellen hergestellt wird und korrekt in den Zellkern transloziert. Es konnte somit davon ausgegangen werden, daß E2F1-regulierte Gene induziert werden können.

3.1.2 Mikroarray Analyse zur Identifizierung neuer E2F1-regulierter Faktoren

Der Einfluß von E2F1 auf die transkriptionelle Aktivierung verschiedenster Gene ist in der Literatur beschrieben (Slansky und Farnham, 1996). Die Identifizierung neuer Faktoren, die noch nicht als von E2F1-reguliert beschrieben waren, sollten mit Hilfe der Mikroarray-technologie und cDNA Sonden aus 4-Hydroxy-Tamoxifen induzierten Saos-2 ER-E2F1-Zellen erfolgen. Hybridisierungssonden wurden aus Saos-2 ER-E2F1-Zellen hergestellt, die nach 24stündigem Serumentzug (zur Unterdrückung endogener E2F1-Aktivität) für 8 h mit 4-OHT induziert wurden. Mit 8400 Gen- und EST-Sequenzen - in doppelter Ausführung auf der Membran der Mikroarrays angebracht - ergab sich nach Aufnahme der Signalmuster (Abb. 3.7) eine große Anzahl von Daten, die vom Array Hersteller mit der geeigneten Software ausgewertet wurde.

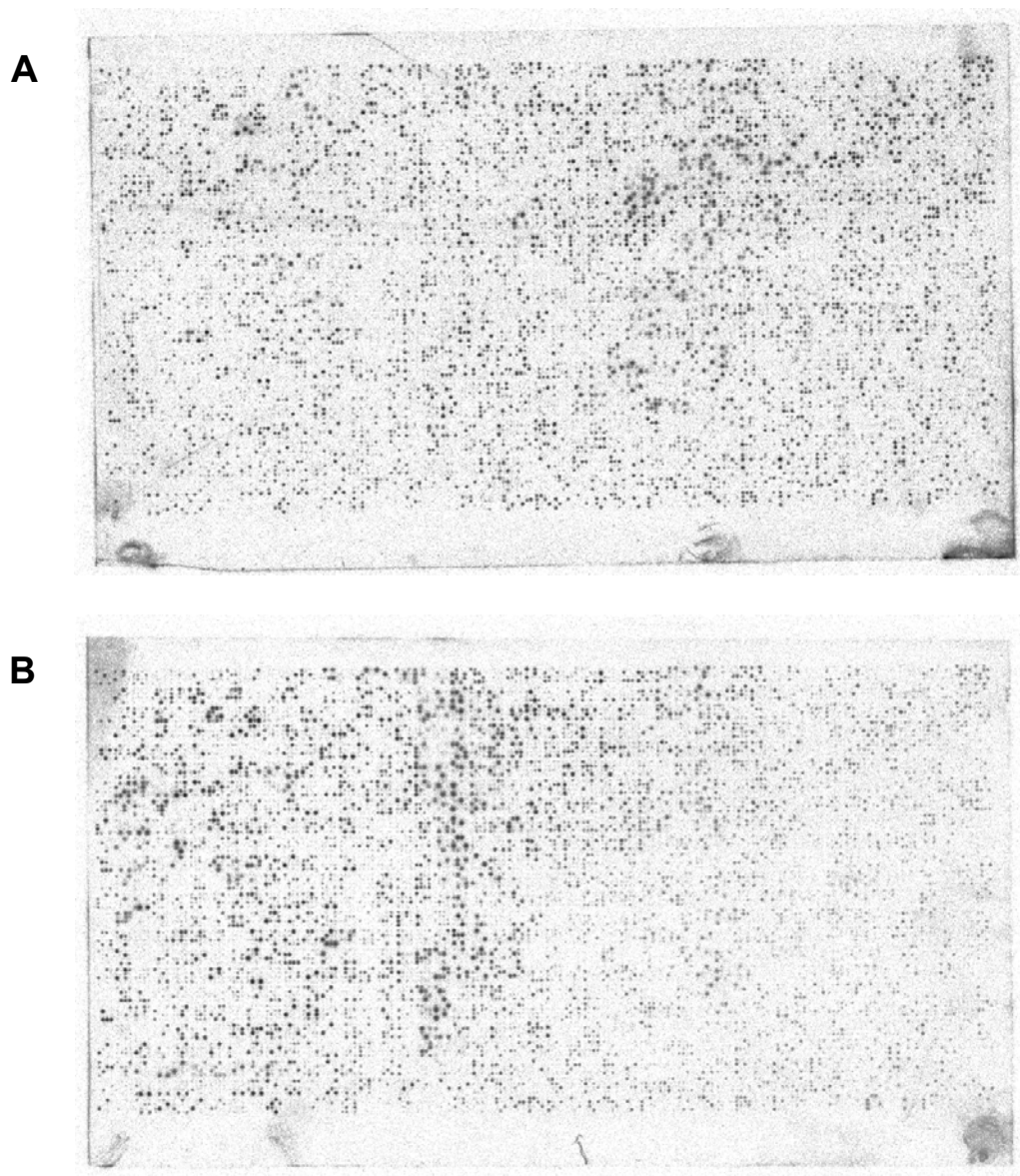


Abb. 3.7 E2F1 verändert das Expressionsmuster vieler Gene. Mikroarrayaufnahme von zwei exakt gleichen Array-Membranen nach Hybridisierung mit cDNA Sonden aus 8 h 4-OHT induzierten (B) und unbehandelten (A) Saos-2 ER-E2F1-Zellen, die zuvor 24 h unter Serumentzug gehalten wurden. Die Arrays wurden auf einem Phosphorimager über Nacht exponiert.

Zur Verifizierung der Array-Daten wurde ein Schwellenwert festgelegt. Ein mögliches E2F1-reguliertes Gen mußte sich in seiner Signalintensität mindestens 2fach von dem Array der unbehandelten Sonde unterscheiden. Da für das Auffinden neuer pro-apoptotischer Faktoren nur solche Gene interessant sind, die durch E2F1 positiv reguliert werden, wurden die durch E2F1 reprimierten Gene zunächst unberücksichtigt gelassen und nur die in Frage kommenden Gene in einer Tabelle (siehe Anhang) zusammengestellt. 470 der 8400 Zielsequenzen wurden durch E2F1 über dem Schwellenwert positiv aktiviert. Diese Anzahl von Genen und ESTs entspricht 5,5% aller Sequenzen auf dem Array. Darunter sind 13,4% ESTs. Dies entspricht etwa dem Anteil aller ESTs (20%) an der Gesamtmenge der Arraysequenzen.

3.1.3 Verifizierung der Mikroarray-Daten

Um die Qualität der Mikroarray-Daten und des gesetzten Schwellenwertes zu überprüfen, wurden 30 zufällig ausgewählte mögliche E2F1-regulierte Zielgene (Aktivierung von 2fach bis 17fach; siehe Tabelle 3.1) mittels RT-PCR mit sequenzspezifischen Primern verifiziert.

Symbol	Ratio +/- 4-OHT	Beschreibung
Neue Gene		
ARHGAP4	4.8	Rho GTPase activating protein 4
BAD	3.5	BCL2-antagonist of cell death
BAK1	3.1	BCL2-antagonist/killer 1
BID	4.7	BH3 interacting domain death agonist
CD9	2.5	CD9antigen (p24)
CFLAR (FLIP)	8.3	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
CLU	4.2	Clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40, 40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)
CRADD	2.1	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
ENO2	2.5	Enolase 2, (gamma, neuronal)
FAT	6.5	FAT tumor suppressor (Drosophila) homolog
FGF-2	4.0	Fibroblast growth factor 2 (basic)
FGFR3	4.6	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)
HLA-DMA	5.3	Major histocompatibility complex, class II, DM alpha
IFNA2	7.8	Interferon, alpha 2
KIAA0455	13.0	KIAA0455 gene product
KIAA0767	12.9	KIAA0767 gene product
MAP3K14	5.2	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
MAPK12	6.8	Mitogen-activated protein kinase 12
MAPK14	3.7	Mitogen-activated protein kinase 14
MMP16	17.1	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)
PAWR	6.0	PRKC, apoptosis, WT1, regulator
RAD52	10.4	RAD52 (S. cerevisiae) homolog
RFC3	14.2	Replication factor C (activator 1) 3 (38kD)
SERPINF2	9.9	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (α -2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 2
STK15	4.5	Serine/threonine kinase 15
TNFSF9	2.9	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
TP53BP2	2.2	Tumor protein p53-binding protein, 2
TRA1	4.4	Tumor rejection antigen (gp96) 1
UNG2	2.6	Uracil-DNA glycosylase 2
VEGF-B	15.6	Vascular endothelial growth factor B
Bekannte Gene		
CCND1	3.2	Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)
CCNE1	4.2	Cyclin E1
CCNE2	6.4	Cyclin E2
MAP3K5	3.9	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5

Tabelle 3.1 Übersicht von 30 ausgewählten Kandidatengenen. Alphabetische Tabelle 30 möglicher E2F1-regulierter Zielgene. Ratio der Signalintensitäten bezieht sich auf die Werte des 8 h Arrays normalisiert auf die Intensitäten des jeweiligen Gens auf dem unbehandelten Array. Gensymbole und Beschreibungen stammen von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>.

Ein erster Hinweis für die Qualität der Array-Daten wurde durch die Identifizierung von vier bereits beschriebenen E2F1-aktivierten Genen oberhalb des Schwellenwertes gefunden (Müller et al., 2001).

Die meisten Zielgene zeigten eine signifikant erhöhte mRNA-Expression 8 h nach E2F1-Induktion (vgl. KIAA0767, STK15, MMP16 in Abb. 3.8)

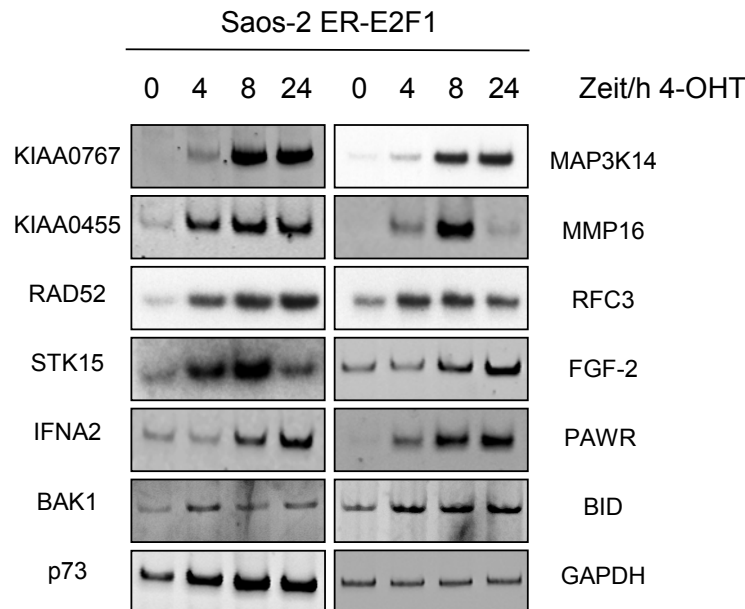


Abb. 3.8 Semi-quantitative RT-PCR in Saos-2 ER E2F1-Zellen. Zwölf positiv verifizierte der 30 ausgewählten Zielsequenzen sind dargestellt. RT-PCR an RNA aus Zellen, die nach 24 h Serumentzug mit 4-OHT für die angegebenen Zeiten induziert wurden. p73 und GAPDH dienten als Positiv- und RT-PCR Ladekontrolle.

24 der 30 Gene (80%) wurden durch RT-PCR bestätigt. *CLU*, *CRADD*, *FAT*, *HLA-DMA*, *MAPK12* und *MAPK14* wurden nicht als E2F1-reguliert bestätigt.

Es zeigte sich, daß die Array-Daten für die gesicherte Aussage, daß ein Gen durch E2F1 reguliert wird, nicht ausreichen. Deswegen wurde ein unabhängiges Experiment für die Validierung der Daten hinzugezogen.

Um die Art der Regulation durch E2F1 genauer zu charakterisieren wurden Zielgene in Anwesenheit des *de novo* Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid (CHX) induziert. Dabei kann zwischen direkt und indirekt durch E2F1-aktivierten Zielgenen unterschieden werden. Gene, die in Anwesenheit von CHX nicht von E2F1 aktiviert werden können, benötigen vermutlich weitere Mediatoren für ihre Transaktivierung.

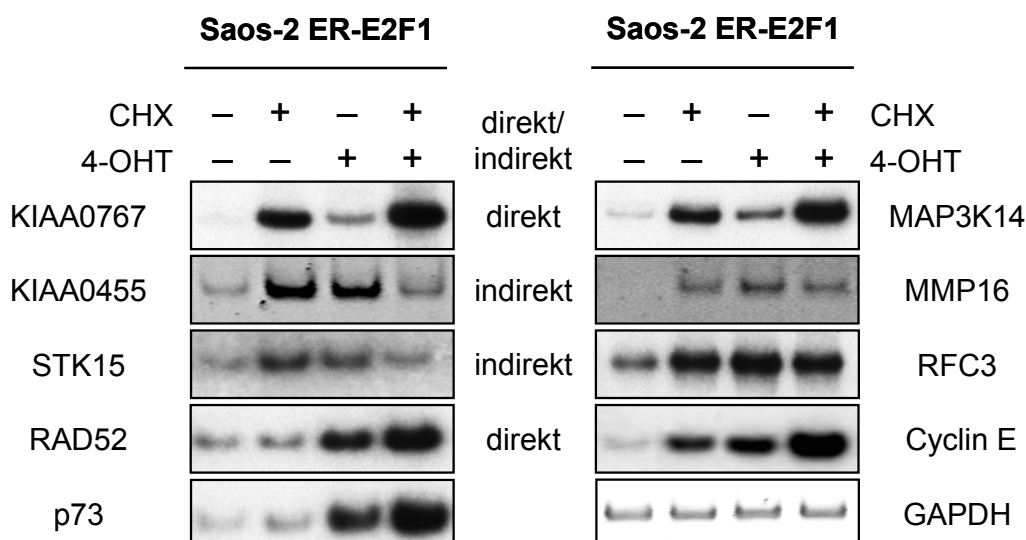


Abb. 3.9 Semi-quantitative RT-PCR zur Klassifizierung von Zielgenen in Saos-2 ER-E2F1-Zellen. Serumfreie Zellen wurden 4 h in Gegenwart von 4-OHT und/oder CHX wachsen gelassen. Die RT-PCR wurde für sieben als E2F1-reguliert bestätigte Gene und drei Kontrollen unter linearen Amplifizierungsbedingungen durchgeführt. Anhand des Bandenmusters wurde die Klassifizierung als direktes oder indirektes Zielgen angegeben. p73 und Cyclin E wurden als Positivkontrollen für direkte Zielgene und GAPDH als RT-PCR Ladekontrolle verwendet.

KIAA0767, MAP3K14 und RAD52 konnten als direkte E2F1-regulierte Gene identifiziert werden (Abb. 3.9). Die Regulation von KIAA0455, MMP16, STK15 und RFC3 durch E2F1 dagegen ist indirekt und benötigt die Proteinsynthese zusätzlicher Proteine.

Um zu prüfen, ob die beobachteten Effekte ebenfalls in primären Zellen nachweisbar sind, wurden humane Fibroblasten verwendet. Normale diploide VH6 Vorhautfibroblasten wurden 24 h in serumfreiem Medium kultiviert und anschließend mit einem Adenovirus infiziert, das das Fusionsprotein ER-E2F1 exprimiert (Ad.CMV.ER-E2F1). 24 h nach der Infektion wurden die Zellen mit 1 μ M 4-OHT versetzt und nach 0, 8 und 24 h die RNA isoliert und für RT-PCR Untersuchungen verwendet.

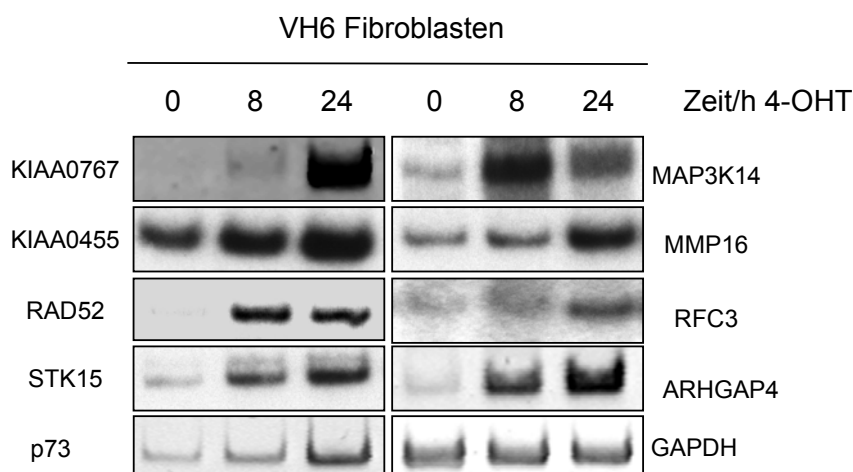


Abb. 3.10 Semi-quantitative RT-PCR in VH6 Fibroblasten. Serumfreie Zellen wurden 24 h nach Infektion mit Ad.CMV.ER-E2F1 für 0, 8, 24 h mit 4-OHT induziert. Acht als E2F1-reguliert bestätigte Gene und die beiden Kontrollen p73 und GAPDH wurden mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert.

Maximale Induktion von Zielgenen in VH6 Fibroblasten wurde 8 bis 24 h nach E2F1-Aktivierung beobachtet (vgl. KIAA0767, KIAA0455 und MAP3K14 in Abb. 3.10). Die beobachtete Transaktivierung der bestätigten Gene wurde durch das ER-E2F1-Fusionsprotein ausgelöst und konnte in primären und Tumorzellen gezeigt werden. Zur Bestätigung dieses Effektes wurde endogenes E2F1 in Saos-2 ER-E2F1-Zellen nach Serumentzug durch 15%ige Serumzugabe 8 h induziert. Die isolierte RNA wurde erneut für RT-PCR Analysen eingesetzt.

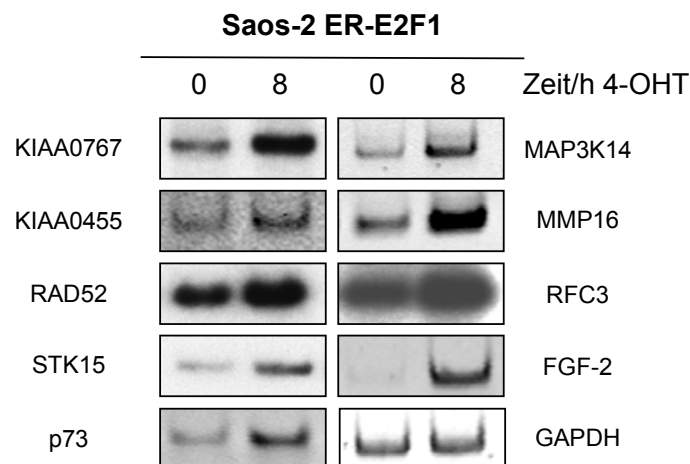


Abb. 3.11 Semi-quantitative RT-PCR in Saos-2 ER-E2F1-Zellen. Serumfreie Zellen wurden für 0 und 8 h mit 15% fetalem Kälberserum (FCS) induziert. Acht E2F1-regulierte Gene und die Kontrollen p73 und GAPDH wurden mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert.

Endogenes E2F1 aktivierte die Genexpression von z.B. KIAA0767, KIAA0455 und FGF-2 (Abb. 3.11).

In den RT-PCR Experimenten wurde die Induktion verschiedener Zielgene durch endogenes und exogenes E2F1 in unterschiedlichen Zellsystemen gezeigt, außerdem konnte die Art der Regulation durch E2F1 näher charakterisiert werden. In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der RT-PCR Analysen für die 24 durch E2F1 positiv regulierten Gene zusammengefaßt. Nach Literaturrecherche unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/> wurden die neuen E2F1-Zielgene abhängig von deren zellulären Funktionen in Gruppen klassifiziert.

Symbol	GenBank No.	Unigene	Ratio +/- 4-OHT	Direktes bzw. indirektes E2F1 Zielgen	Induktion durch Serum	Induktion in VH6
Zellzykluskontrolle-/DNA-replikations- oder centrosomalduplikations-relevante Gene						
ARHGAP4	X78817	3109	4.8	i	+	+
RAD52	U12134	89571	10.4	d	+	+
RFC3	L07541	115474	14.2	i	+	+
STK15	NM_003600	48915	4.5	i	+	+
TNFSF9	AI908454	1524	2.9	n.b.	n.b.	n.b.
TRA1	AI917911	82689	4.4	i	n.b.	-

Apoptoserelevante Gene						
BAD	AW007022	76366	3.5	n.b.	n.b.	n.b.
BAK1	AI741331	93213	3.1	n.b.	n.b.	n.b.
BID	AA582021	172894	4.7	n.b.	n.b.	n.b.
CFLAR (FLIP)	NM_003879	195175	8.3	n.b.	+	-
MAP3K14	Y10256	47007	5.2	d	+	+
PAWR	AA749295	176090	6.0	n.b.	n.b.	n.b.
Tumorentstehungs-relevante Gene						
FGF-2	NM_002006	56066	4.0	n.b.	+	n.b.
FGFR3	AI378807	1420	4.6	n.b.	n.b.	n.b.
MMP16	NM_005941	90800	17.1	i	+	+
TP53BP2	AI123916	44585	2.2	n.b.	n.b.	n.b.
VEGF-B	U48801	78781	15.6	i	n.b.	+
Andere						
CD9	M38690	1244	2.5	i	n.b.	n.b.
ENO2	X51956	146580	2.5	n.b.	n.b.	n.b.
IFNA2	V00549	211575	7.8	n.b.	n.b.	n.b.
KIAA0455	AB007924	13245	13.0	i	+	+
KIAA0767	AL096766	95180	12.9	d	+	+
SERPINF2	J02654	159509	9.9	n.b.	n.b.	n.b.
UNG2	AK026075	3041	2.6	n.b.	n.b.	n.b.
Bekannte E2F1-Zielgene						
CCND1	M73554	82932	3.2	n.b.	n.b.	n.b.
CCNE1	BE733577	9700	4.2	d	+	+
CCNE2	AF091433	30464	6.4	n.b.	n.b.	n.b.
MAP3K5	NM_005923	151988	3.9	n.b.	n.b.	n.b.
p73*	NM_005427	247753	n.a.	d	+	+

Tabelle 3.2 Klassifizierung der 24 positiven E2F1-regulierten Zielgene und Überblick der RT-PCR Analysen.

* p73 war **nicht** auf dem Mikroarray vorhanden; es wurde als Positivkontrolle für Verifizierungsexperimente benutzt. Ratio +/- 4-OHT bezieht sich auf die Messungen der Mikroarrays; + = positiv; - = negativ; d = direktes Zielgen; i = indirektes Zielgen; n.b. = nicht bestimmt; n.a. = nicht auf dem Array. GenBank Nummern wurden wie vom Hersteller angegeben übernommen. Gensymbole und Unigene Einträge sind angegeben wie unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>.

3.2 Neue E2F1-regulierte Faktoren mit pro-apoptotischer Funktion

Mit Hilfe der Array- und RT-PCR-Technologie wurde eine Vielzahl von neuen bisher noch nicht als E2F1-Zielgen beschriebenen Kandidaten gefunden (Tabelle 3.2 und Anhang). Da E2F1 nicht nur pro-apoptotische, sondern auch proliferationsrelevante Gene induziert, wurden funktionelle Analysen mit den entsprechenden Vollängengenen durchgeführt. Hierbei wurden für die Analyse solche Gene verwendet, denen bislang noch keine Funktion zugeordnet werden konnte. Zur Analyse möglicher pro-apoptotischer Funktion wurden KIAA Genprodukte ausgewählt, die im Zuge der Sequenzierungen des '*human genome projects*' als Gene mit offenem Leserahmen identifiziert wurden. Die selektierten Genprodukte wurden aufgrund ihrer deutlichen Transaktivierung durch E2F1 als vielversprechende Faktoren ausgewählt. KIAA0455 und KIAA0767 zeigten eine veränderte Genexpression von 13fach bzw. 12,9fach als Folge von E2F1-Aktivierung. Müller et al. (2001) zeigten, daß KIAA0717 in U2OS Zellen durch E2F1 14,7fach aktiviert wurde. Diese drei Faktoren wurden für die funktionelle Analyse herangezogen.

Die Aktivierung von KIAA0717 wurde zuerst im etablierten Saos-2 ER-E2F1- und VH6-Zellsystem untersucht.

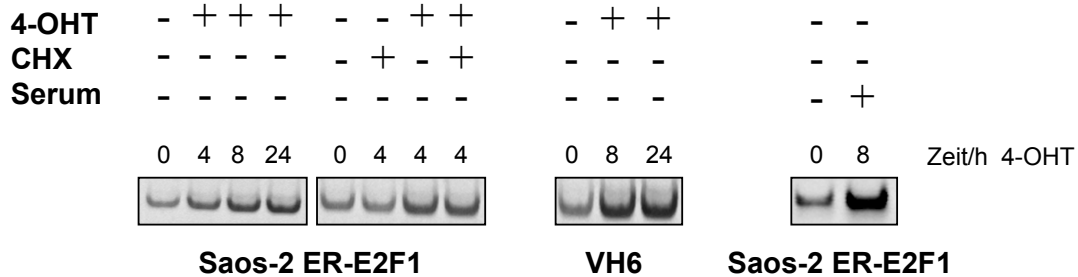


Abb. 3.12 Semi-quantitative RT-PCR in Saos-2 ER-E2F1-Zellen und VH6 Fibroblasten auf KIAA0717. Serumfreie Zellen wurden für 0, 4, 8 oder 24 h mit 4-OHT und/oder CHX wie angegeben induziert.

KIAA0717 konnte als direktes Zielgen von E2F1 identifiziert werden, da es sich in Anwesenheit von CHX in gleichem Maße von E2F1 aktivieren läßt wie ohne den Proteinsyntheseinhibitor. Es konnte durch endogenes E2F1 genauso aktiviert werden wie in primären Zellen (Abb. 3.12).

3.2.1 Vollängerklonierung von KIAA0455, KIAA0717 und KIAA0767

Die kodierenden Sequenzen der drei KIAA-Gene wurden in GenBank Analysen identifiziert und die Vollängengene mit sequenzspezifischen Primern des Initiationscodons in einer Einschnitt 'high fidelity' PCR-Amplifikation unter Aussparung des Terminationscodons amplifiziert. Die Vollängen-cDNAs wurden in den pCR2.1-TOPO Vektor und dann gerichtet in den pCDNA 3.1/myc-His kloniert und die Nukleotidabfolge durch Sequenzierungen verifiziert. Das Proteinprodukt der jeweiligen Gene wurde in einer gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/Translations-Reaktion erzeugt.

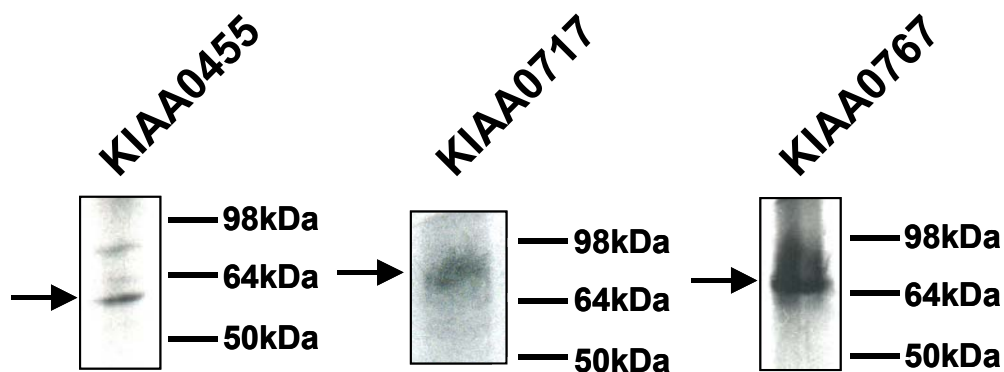


Abb. 3.13 *in vitro* Translation der drei KIAAs. 0,5 µg pCDNA Plasmid wurden translatiert und ein Aliquot der ³⁵S-markierten Proteine per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Hauptprodukte sind durch Pfeile markiert.

Ein eindeutiges Proteinsignal war bei KIAA0717 und KIAA0767 sichtbar. KIAA0455 zeigte zusätzlich zum Hauptprodukt noch zwei weitere Banden (Abb. 3.13). Daher waren die durch PCR-Amplifikation entstandenen Vollängerkonstrukte für die Protein-Expression

verwendbar. Das tatsächliche Molekulargewicht der drei KIAA-Proteine ist in bezug zur erwarteten Größe und zur Länge der kodierenden Sequenz in Tabelle 3.3 dargestellt.

	cDNA Länge	Theoretisches Molekulargewicht	Tatächliches Molekulargewicht
KIAA0455	1818 bp	~ 66 kDa	~ 60 kDa
KIAA0717	2184 bp	~ 80 kDa	~ 88 kDa
KIAA0767	1737 bp	~ 64 kDa	~ 66 kDa

Tabelle 3.3 Gen- und Proteingrößen der drei KIAAs. Übersicht der tatsächlichen und theoretisch erwarteten Größen der Proteine ausgehend von der kodierenden Gengröße. Tatsächliche Proteingröße wurde anhand des Markers abgeschätzt. Theoretische Proteingröße wurde wie folgt errechnet: Anzahl der Codons x 0,11 kDa = Molgew. in kDa.

Zur funktionellen Analyse der drei Proteine wurden *in vitro* Experimente durchgeführt. Zur Sicherstellung eines effektiven Gentransfers in die Zielzellen wurden adenovirale Vektoren der jeweiligen KIAAs mit dem AdEasy System hergestellt. Dazu wurden ausgehend von den pCDNA 3.1/ myc-His KIAA-Konstrukten die Vollängengene ohne das His *tag* gerichtet in pAdTrack.CMV 'Shuttle'-Vektoren kloniert und der Ad-Vektor wie beschrieben (vgl. 2.2.6.2) propagiert.

3.2.2 KIAAs beeinflussen die Zellvitalität in verschiedenen Zellsystemen

Als erster Funktionstest der drei KIAA-Genprodukte wurde der zytotoxische Einfluß jedes Proteins nach Überexpression geprüft. Nach Behandlung der Zellen wurde die Umsetzung eines Farbstoffes in den Mitochondrien photometrisch gemessen. Dabei ist die Farbstoffintensität proportional zur Anzahl lebender Zellen. Hierzu wurden p53-negative Saos-2 und H1299 Zellen mit Adenoviren der drei KIAAs infiziert und die Zellvitalität über einen Zeitraum von vier Tagen gemessen.

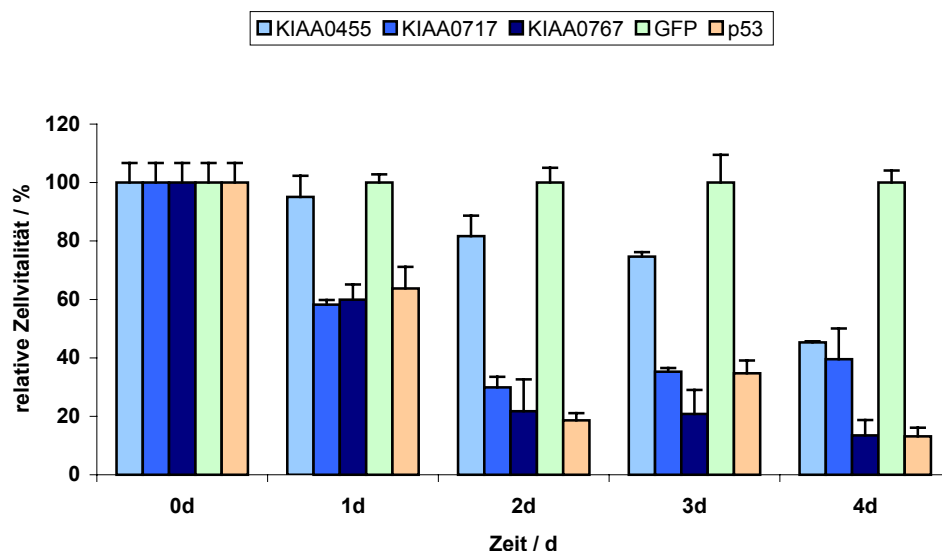


Abb. 3.14 MTT-Assay in Saos-2 Zellen. Saos-2 Zellen wurden mit Ad.CMV.KIAA0455 (hellblau), Ad.CMV.KIAA0717 (blau), Ad.CMV.KIAA0767 (dunkelblau) oder als Positiv- und Negativkontrolle mit Ad.CMV.p53wt (orange) und Ad.CMV.GFP (grün) infiziert, und alle 24 h über einen Zeitraum von vier Tagen wurde die Zellvitalität photometrisch bestimmt. Die prozentuale Zellvitalität wurde ermittelt, indem der jeweilige Ad.CMV.GFP Wert zu jedem Meßzeitpunkt als 100% überlebende Zellen gesetzt wurde. Standardabweichungen ergaben sich aus 3fach Bestimmungen. Das Ergebnis eines repräsentativen von mindestens drei unabhängigen Assays ist gezeigt.

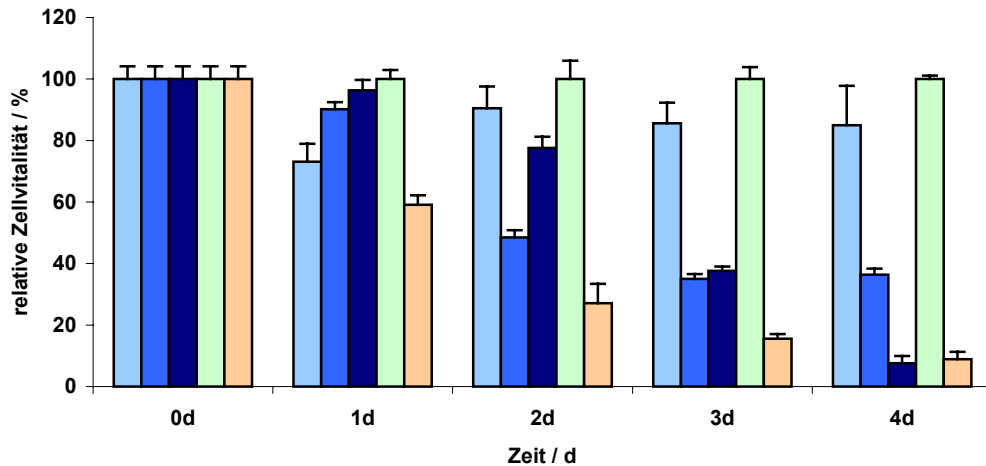


Abb. 3.15 MTT-Assay in H1299 Zellen. H1299 Zellen wurden mit Ad.CMV.KIAA0455 (hellblau), Ad.CMV.KIAA0717 (blau), Ad.CMV.KIAA0767 (dunkelblau) oder als Positiv- und Negativkontrolle mit Ad.CMV.p53wt (orange) und Ad.CMV.GFP (grün) infiziert, und alle 24 h über einen Zeitraum von vier Tagen wurde die Zellvitalität photometrisch bestimmt. Die prozentuale Zellvitalität wurde ermittelt, indem der jeweilige Ad.CMV.GFP Wert zu jedem Meßzeitpunkt als 100% überlebende Zellen gesetzt wurde. Standardabweichungen ergaben sich aus 3fach Bestimmungen. Das Ergebnis eines repräsentativen von mindestens drei unabhängigen Assays ist gezeigt.

KIAA0455 und KIAA0717 reduzierten die Zellzahl um 60% in Saos-2, p53wt und KIAA0767 um mehr als 80% nach vier Tagen (Abb. 3.14). In H1299 dagegen reduzierte KIAA0455 die Zahl der überlebenden Zellen nur marginal, während KIAA0717 auf 60% der Zellen toxisch und p53 und KIAA0767 toxisch auf 90% der Zellen wirkten (Abb.3.15).

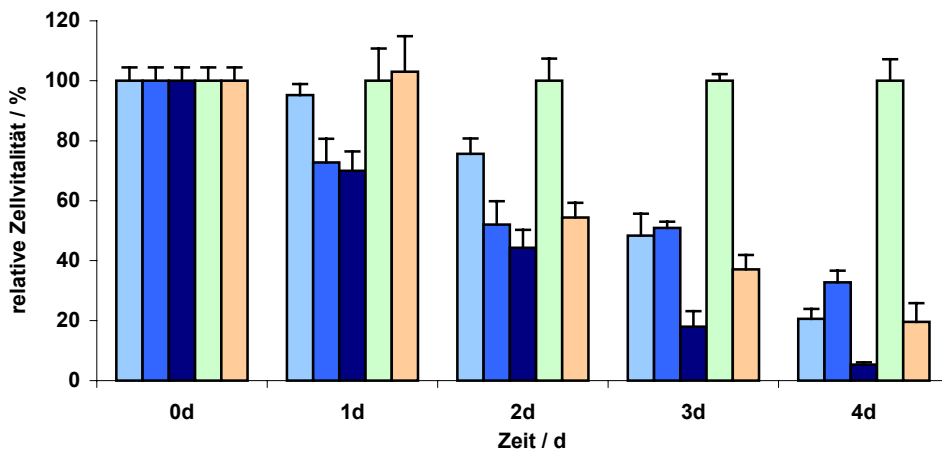


Abb. 3.16 MTT-Assay in HCT ^{+/+} Zellen. HCT^{+/+} Zellen wurden Ad.CMV.KIAA0455 (hellblau), Ad.CMV.KIAA0717 (blau), Ad.CMV.KIAA0767 (dunkelblau) oder als Positiv- und Negativkontrolle mit Ad.CMV.p53wt (orange) und Ad.CMV.GFP (grün) infiziert, und alle 24 h über einen Zeitraum von vier Tagen wurde die Zellvitalität photometrisch bestimmt. Die prozentuale Zellvitalität wurde ermittelt, indem der jeweilige Ad.CMV.GFP Wert zu jedem Meßzeitpunkt als 100% überlebende Zellen gesetzt wurde. Standardabweichungen ergaben sich aus 3fach Bestimmungen. Das Ergebnis eines repräsentativen von mindestens drei unabhängigen Assays ist gezeigt.

Da die beiden zuvor verwendeten Tumorzelllinien kein funktionelles p53 besitzen, wurde überprüft, ob die Anwesenheit dieses Tumorsuppressors einen Einfluß auf die beobachteten Effekte hat. Dazu wurde in humanen p53-positiven (HCT^{+/+}) und p53-

negativen (HCT^{-/-}) Colonkarzinomzellen die Proteinüberexpression durch adenovirale Infektion aktiviert.

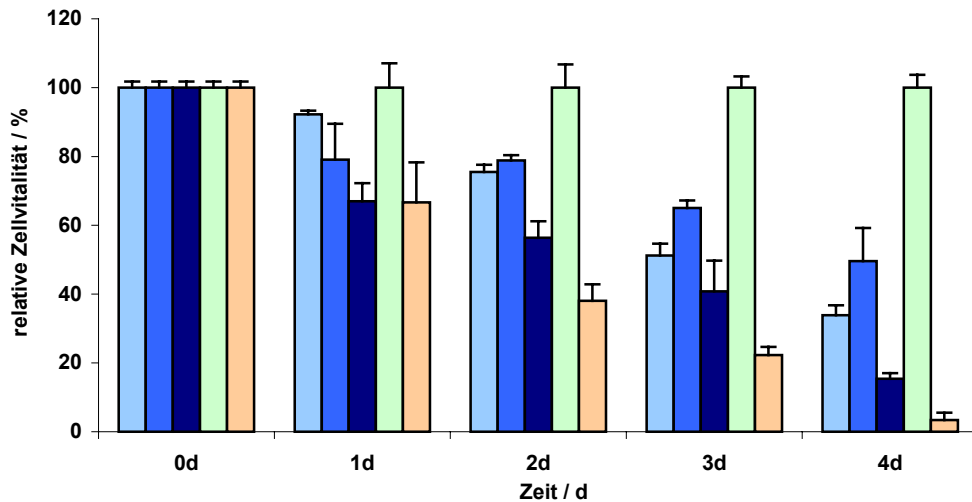


Abb. 3.17 MTT-Assay in HCT^{-/-} Zellen. p53-negative HCT^{-/-} Zellen wurden mit Ad.CMV.KIAA0455 (hellblau), Ad.CMV.KIAA0717 (blau), Ad.CMV.KIAA0767 (dunkelblau) oder als Positiv- und Negativkontrolle mit Ad.CMV.p53wt (orange) und Ad.CMV.GFP (grün) infiziert, und alle 24 h über einen Zeitraum von vier Tagen wurde die Zellvitalität photometrisch bestimmt. Die prozentuale Zellvitalität wurde ermittelt, indem der jeweilige Ad.CMV.GFP Wert zu jedem Meßzeitpunkt als 100% überlebende Zellen gesetzt wurde. Standardabweichungen ergaben sich aus 3fach Bestimmungen. Das Ergebnis eines repräsentativen von mindestens drei unabhängigen Assays ist gezeigt.

In p53-positiven HCT-Tumorzellen wurde durch KIAA0455 die Zellvitalität um 80% und durch KIAA0717 um 70% reduziert. Bei KIAA0767 war eine fast vollständige Abnahme der Zahl lebender Zellen zu beobachten (Abb. 3.16). Das Tumorsuppressorprotein p53 führte in dieser Zelllinie zu 20% überlebenden Zellen.

In p53-negativen HCT-Zellen dagegen wurde durch p53wt-Expression die Zellvitalität komplett aufgehoben. Die KIAAs reduzierten die Zellpopulation um 60 (KIAA0455), 50 (KIAA0717) bzw. 80% (KIAA0767).

Schließlich wurde die Zellvitalität von primären Zellen nach Überexpression des jeweiligen Proteins ermittelt. Humane diploide VH6 Vorhautfibroblasten wurden dazu infiziert und die Anzahl der überlebenden Zellpopulation analog zu vorherigen Experimenten ermittelt.

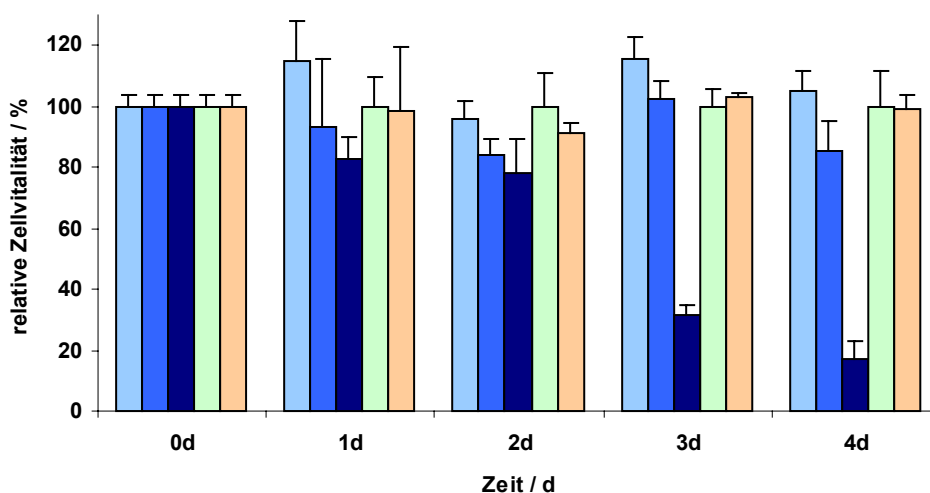


Abb. 3.18 MTT-Assay in VH6 Zellen. Humane diploide VH6 Fibroblasten wurden mit Ad.CMV.KIAA0455 (hellblau), Ad.CMV.KIAA0717 (blau), Ad.CMV.KIAA0767 (dunkelblau) oder als Positiv- und Negativkontrolle mit Ad.CMV.p53wt (orange) und Ad.CMV.GFP (grün) infiziert, und alle 24 h über einen Zeitraum von vier Tagen wurde die Zellvitalität photometrisch bestimmt. Die prozentuale Zellvitalität wurde ermittelt, indem der jeweilige Ad.CMV.GFP Wert zu jedem Meßzeitpunkt als 100% überlebende Zellen gesetzt wurde. Standardabweichungen ergaben sich aus 3fach Bestimmungen. Das Ergebnis eines repräsentativen von mindestens drei unabhängigen Assays ist gezeigt.

Weder der Tumorsuppressor p53 noch KIAA0455 oder KIAA0717 zeigten eine signifikante Veränderung der Anzahl überlebender Zellen. Lediglich KIAA0767 reduzierte die Zellvitalität um 80% (Abb. 3.18).

KIAA0717 und KIAA0767 zeigten nach 4tägiger Überexpression den deutlichsten zytotoxischen Effekt auf die verschiedenen Zelllinien (p53-abhängig und -unabhängig). KIAA0767 reduzierte sogar im Gegensatz zu p53 die Anzahl primärer Zellen.

3.2.3 KIAA0767-Expression führt zu erhöhter sub-G1 Population, KIAA0717 ruft einen G2/M-Arrest hervor

Um festzustellen, ob die Verminderung der Anzahl lebender Zellen durch Apoptose hervorgerufen wurde, wurden nach Überexpression von KIAA0717 und KIAA0767 mit Hilfe der Durchflusszytometrie Zellzyklusprofile erstellt.

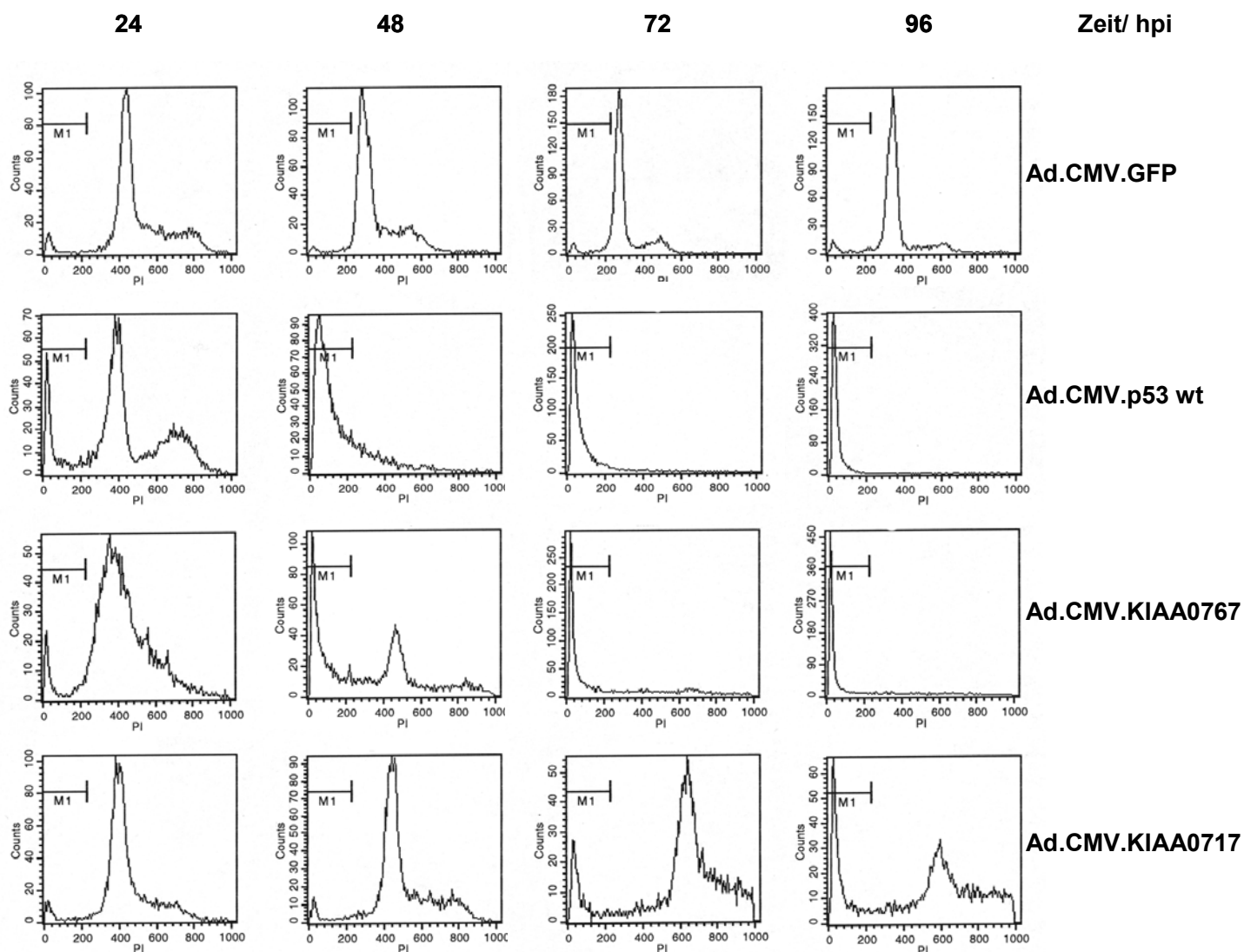


Abb. 3.19 Durchflusszytometrische Analyse von Zellzyklusprofilen infizierter H1299 Zellen. Zellen wurden mit den angegebenen Adenoviren infiziert, und nach 24, 48, 72 und 96 hpi (hours post infection) fixiert und in einem Becton Dickinson FACS Vantage Durchflusszytometer mit der CellQuestSoftware analysiert. Die sub-G1 Populationen sind durch den M1 Balken markiert. Ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

24 h nach der Infektion mit Ad.CMV.p53wt (Positivkontrolle) war das Entstehen einer sub-G1 Population als typisches Zeichen apoptotischer Zellen erkennbar (Abb. 3.19). Die Zellen zeigten einen Chromosomensatz kleiner als 2N. Das Profil unterhalb der Markierung (M1) war deutlich größer als in den GFP-infizierten Kontrollzellen. Nach 48 h waren etwa 80% der p53-infizierten Zellen in der sub-G1 Phase und 72 h nach Infektion waren alle Zellen in der sub-G1 Phase detektierbar.

Zellen, die mit KIAA0767 infiziert wurden, zeigten ebenfalls nach 24 h einen sog. '*shift*' mit Erhöhung des sub-G1 Populationsanteils, der allerdings nicht so ausgeprägt war wie bei p53-infizierten Zellen. Nach 48 h war ein sub-G1 '*peak*' deutlich zu erkennen und ab 72 h befanden sich alle Zellen im sub-G1 Bereich. KIAA0717-infizierte Zellen zeigten bis 48 h nach adenoviraler Infektion ein normal verteiltes Zellzyklusprofil. Ab 72 h kam es zur Erhöhung des Anteils von Zellen in der sub-G1 Phase mit gleichzeitigem Anstieg von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Dieser Effekt prägte sich 96 h nach Infektion aus, wobei dem G2/M-Phase Arrest ein Anstieg der sub-G1 Population folgte.

Die Ergebnisse der Zellvitalitätsassays bestätigten sich bei der Aufnahme der Zellzyklusprofile. KIAA0767-Überexpression führte zur Reduzierung der Anzahl überlebender Zellen durch Induktion apoptotischer Mechanismen vergleichbar mit der Apoptoseinduktion durch p53. Die Abnahme der Zellanzahl durch KIAA0717 war primär auf eine Arretierung in der G2/M-Zellzyklusphase zurückzuführen.

3.2.4 KIAA0767 induziert morphologische Veränderungen und DNA-Fragmentierung

Zur Klärung der durch KIAA0717 und KIAA0767 ausgelösten Effekte wurden die zelluläre Morphologie und die chromosomale Integrität untersucht. Zellen wurden erneut über einen Verlauf von vier Tagen mit KIAA0717 bzw. KIAA0767 infiziert und dann durch Hoechst Färbung angefärbt. Hoechst 33342 Farbstoff färbt apoptotische Zellen weiß-bläulich, normale Zellen dagegen werden durch den Farbstoff nur schwach blau angefärbt (Ormerod et al., 1993). Propidium-Iodid (PI) färbt nur nekrotische Zellen deutlich rot, da es intakte Zellmembranen nicht passieren kann. Lebende Zellen werden durch PI nicht oder nur sehr schwach rot gefärbt (Ormerod et al., 1993).

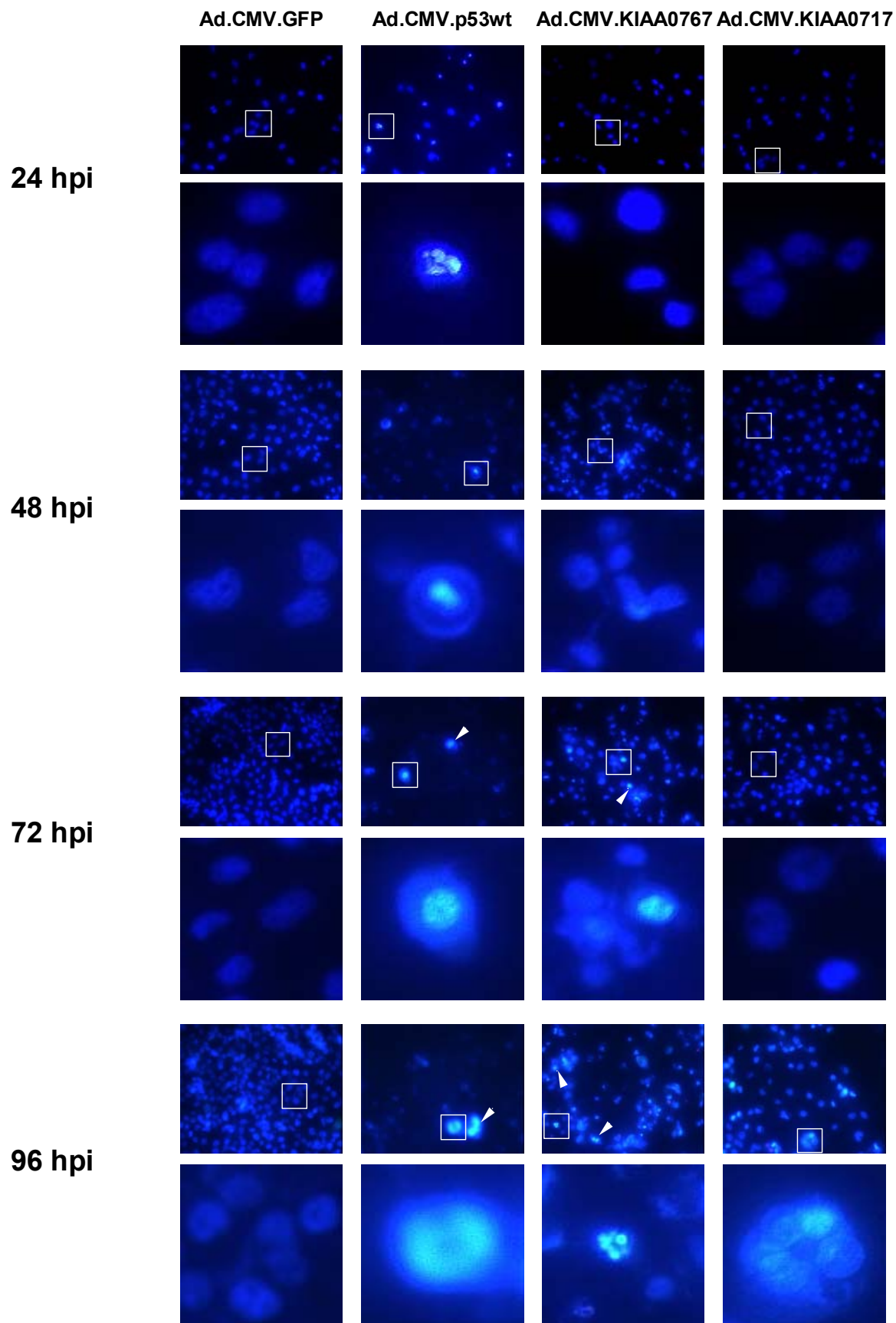


Abb. 3.20 Hoechst 33342 Färbung von H1299 Zellen. Zellen wurden mit Ad.CMV.GFP, Ad.CMV.p53wt, Ad.CMV.KIAA0767 oder Ad.CMV.KIAA0717 infiziert und nach 24, 48, 72 und 96 h mit 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Hoechst 33342 und 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Propidium-Iodid gefärbt. Die jeweils obere Reihe zeigt die Übersicht und die untere Reihe den markierten Ausschnitt. Pfeile deuten auf apoptotische Zellen außerhalb des Ausschnittes hin. Die Zellen wurden bei 20facher Vergrößerung im konfokalen Laser Scan Mikroskop LSM 510 analysiert.

Nach 24stündiger Expression waren einige apoptotische Zellen nur in p53-infizierten Zellen durch kleine sog. apoptotische Körper ('*apoptotic bodies*') identifizierbar (Abb. 3.20). Alle anderen Populationen zeigten normal proliferierende Zellen und die Zellzahl und Zelldichte ist in der Übersicht in diesen Ansätzen etwa gleich. Nach 48 h war die Zellzahl der p53-infizierten Zellen deutlich vermindert, viele Zellen hatten aufgeblähte Membranen ('*membrane blebbing*') und hatten sich von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst. Bei KIAA0767-infizierten Zellen kam es zu diesem Zeitpunkt zur Akkumulation mehrerer Zellen und teilweise waren weißliche Zellen nachweisbar. GFP-Kontrollzellen und KIAA0717-infizierte Zellen zeigten hingegen normales Wachstum ohne Abnormalitäten. Ab 72 h waren in p53-infizierten Zellen kaum noch Zellen sichtbar, die verbliebenen Zellen hatten sich abgelöst, schwammen im Überstand und zeigten große aufgeblähte Formen. KIAA0767-infizierte Zellen waren im Vergleich zu GFP-infizierten Kontrollzellen in ihrer Anzahl vermindert und zeigten deutlich weißliche Zellen. KIAA0717-infizierte Zellen waren bis zu 72 h nach Infektion etwas langsamer gewachsen und hatten eine geringere Zelldichte. Ab 96 hpi waren bei diesem Ansatz erste weißliche Zellen zu sehen. KIAA0767-infizierte Zellen zeigten zu diesem Zeitpunkt deutlich verminderte Zellzahlen und viele Zellen mit apoptotischen Körpern hatten sich abgelöst und schwammen im Überstand.

Ein klassisches Merkmal des programmierten Zelltods ist die Fragmentierung von DNA in nukleosomale Einheiten (DNA '*ladder*'). Da KIAA0767 in den bisherigen Experimenten alle Anzeichen eines pro-apoptotischen Gens zeigte, wurden Zellen infiziert und auf nukleosomale Einheiten überprüft.

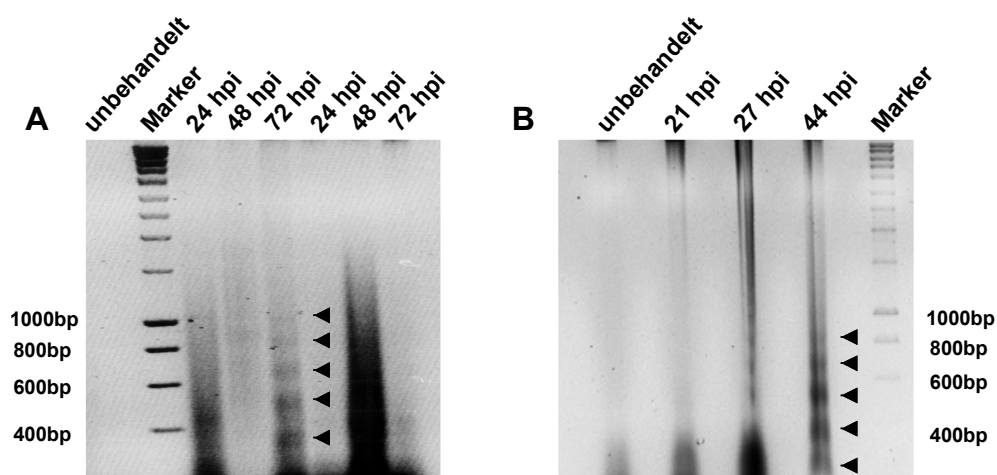


Abb. 3.21 DNA 'ladder' von H1299 Zellen. Die Zellen wurden adenoviral infiziert, die chromosomale DNA wie unter 2.2.7.4 beschrieben aufgearbeitet und auf einem Agarose-TBE-Gel getrennt. **A**, Ad.CMV.KIAA0767-infizierte Zellen Spur 3-5; Ad.CMV.GFP-infizierte Zellen Spur 6-8. **B**, Ad.CMV.p53wt-infizierte Zellen Spur 2-4. Markergröße ist in bp angegeben. DNA-Fragmente sind durch Pfeilköpfe indiziert.

Die Einleitung von Apoptose durch KIAA0767-Überexpression konnte durch das Auftreten von DNA Fragmenten erneut belegt werden (Abb. 3.21). Damit konnte durch Zellvitalitätsassays, die Analyse von Zellzyklusprofilen, die Analyse von zellulärer

Morphologie und die Detektion von nukleosomalen Einheiten gezeigt werden, daß KIAA0767 alle klassischen Eigenschaften eines pro-apoptotischen Gens besitzt.

3.2.5 KIAA0767 induziert typische Todessignaltransduktionskaskaden

Die Apoptoseinduktion wird zellulär über zwei Signaltransduktionswege vermittelt. Neben dem rezeptorvermittelten Weg können Signale unter Beteiligung der Mitochondrien weitergeleitet werden. Beide Signalwege vereinigen sich am Ende in der Aktivierung der gleichen proteolytischen Enzyme (Caspasen). Nach sukzessiver Aktivierung der Caspasen werden Substrate wie die Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) durch Spaltung deaktiviert. Die Spaltung des PARP-Vollängenproteins (116 kDa) wurde durch Detektion des prozessierten Proteinfragmentes (89 kDa) nach KIAA0767-Überexpression im Western Blot überprüft.

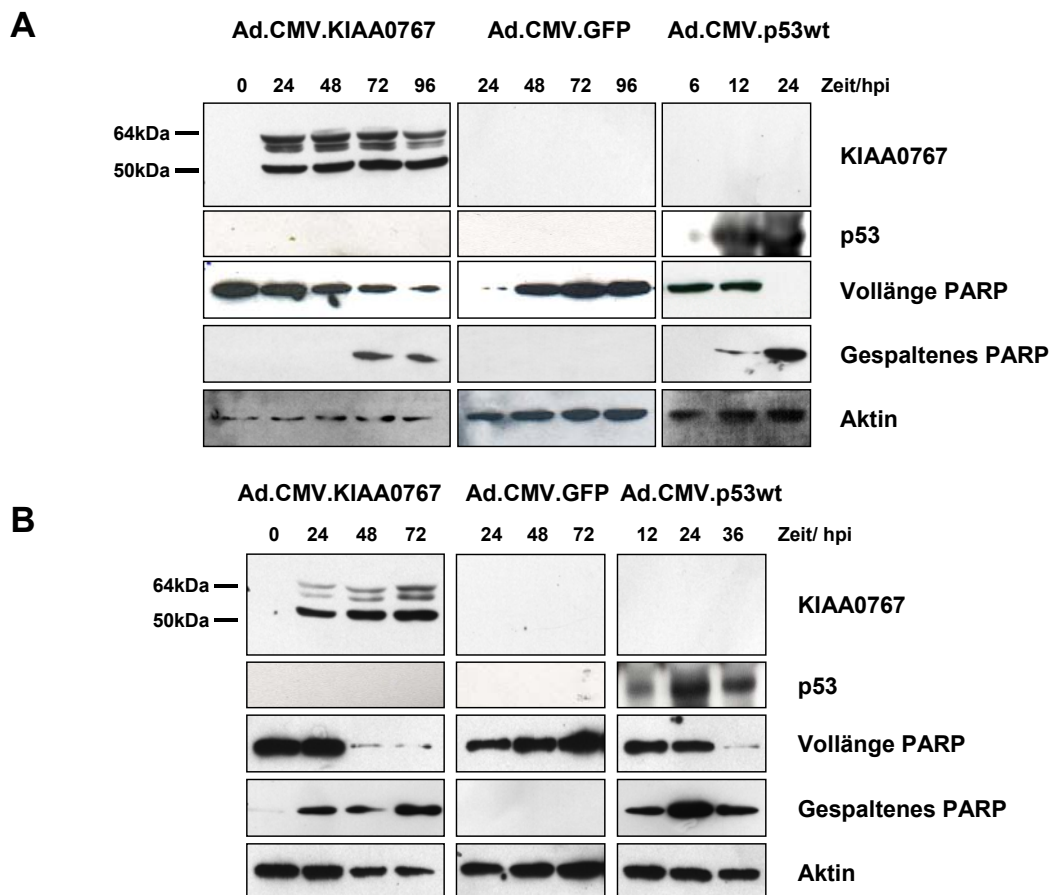


Abb. 3.22 KIAA0767 aktiviert Enzyme der Todessignalkaskade. Western Blot mit Gesamtzellextrakten von (A) H1299 und (B) Saos-2 Zellen. Zellen wurden mit dem angegebenen Transgen für die entsprechende Zeit infiziert und dann das Vorliegen der jeweiligen Proteine nach Trennung auf SDS-PAGE Gelen mit Antikörpern detektiert. Zur Ladekontrolle gleicher Proteinmengen wurden die Blots mit anti-Aktin Antikörpern behandelt.

Das KIAA0767-Protein konnte 24 h nach Infektion durch vier spezifische Banden in beiden Zelllinien detektiert werden. In GFP- und p53-infizierten Zellen war KIAA0767 nicht nachweisbar. p53-Expression war 12 h nach Infektion in beiden Zelllinien deutlich detektierbar. Die Detektion des PARP-Spaltproduktes (89 kD) wurde 12 h nach p53-

Infektion in beiden Zelllinien beobachtet. KIAA0767-Überexpression induzierte PARP-Spaltung 24 h bzw. 72 h nach Infektion in Saos-2 bzw. H1299 Zellen. Kein Spaltprodukt war in GFP-infizierten Zellen detektierbar.

KIAA0767 war nach Überexpression als einziges von den drei untersuchten Proteinen fähig alle typischen Anzeichen von Apoptoseinduktion auszulösen. Daher wurde ausschließlich dieser neue Faktor im weiteren Verlauf untersucht und das KIAA0767-Protein ab diesem Zeitpunkt abgeleitet aus seiner Funktion nur noch als '*death inducing protein*' (Dip) bezeichnet.

3.3 KIAA0767 alias '*death inducing protein*' (Dip)

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden weitere Detailinformationen über diesen neuen pro-apoptotischen Faktor gesammelt. Die '*Map Viewer*' Funktion auf der NCBI Homepage des National Institute of Health (NIH) zeigte, daß die chromosomale Lokalisation von Dip auf Chromosom 22 (q-Arm) an Position 13.31 ist.

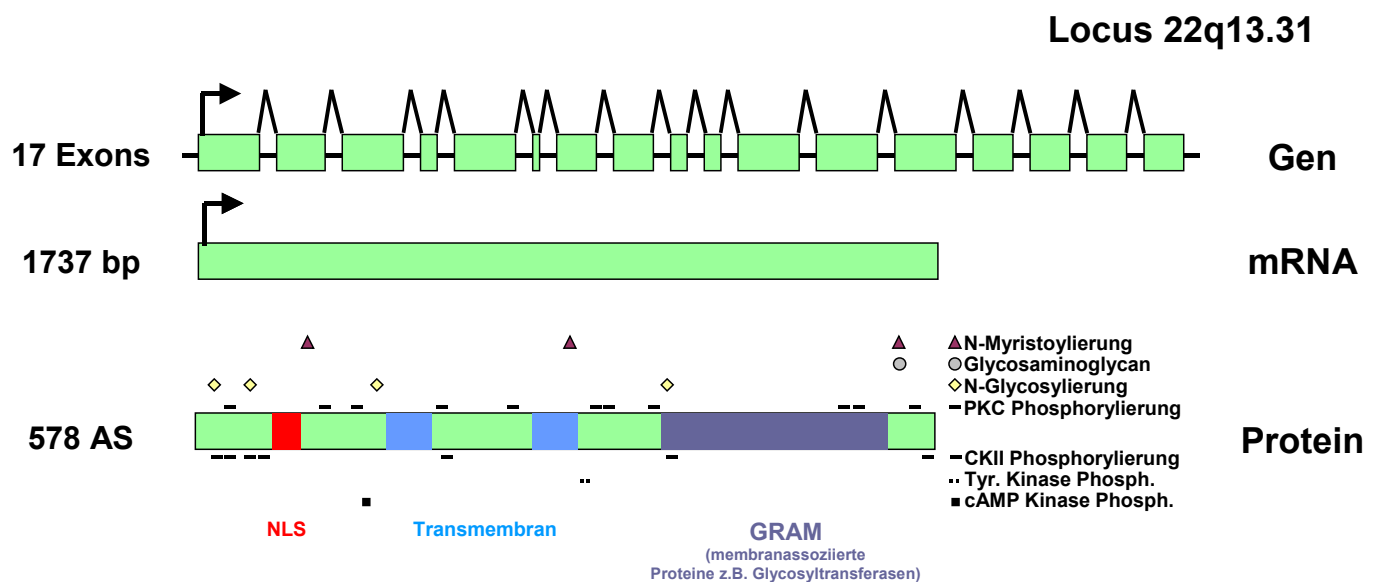


Abb. 3.23 Übersicht Gen-mRNA-Protein von Dip. Das Dip-Gen besitzt 17 Exons, die daraus resultierende mRNA ist 1737 Basenpaare lang und das Dip-Protein hat 578 Aminosäuren. Die Modifikationsdomänen im Protein sind angegeben.

Das Dip-Gen besteht aus 17 Exons und bildet eine 1737 Basenpaar lange mRNA. Das resultierende Protein hat eine Länge von 578 Aminosäuren (Abb. 3.23).

Um Hinweise über die zelluläre Lokalisation und eventuell vorhandene Proteindomänen von Dip zu finden, wurden Datenbankenanalysen durchgeführt und die im Anhang angegebene Proteinsequenz analysiert. Die Informationen sind in Tabelle 3.4 zusammengestellt und in Abb. 3.23 in die Proteindarstellung aufgenommen.

Modifikationsregion/ Domäne	Aminosäure-Position	Verwendete Datenbank
Nukleäre Lokalisations- domäne	110-121	NLSdb
GRAM-Domäne	445-523	Pfam / SMART / Prosite
Transmembran-Domänen (min. 2)	246-268 & 345-367	SMART / TMHMM
N-Myristoylierungs- regionen (3)	147-152, 358-363, 530-535	Prosite / Pep
Glycosaminoglycan- Bindestelle	531-534	Prosite / Pep
Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen (11)	44-46, 163-165, 197-199, 296-298, 335-337, 411-413, 418-420, 441- 443, 499-501, 504-506, 542-546	Prosite / Pep
Caseinkinase II Phospho- rylierungsstellen (7)	28-31, 44-47, 72-75, 105-108, 294- 297, 454-457, 574-577	Prosite / Pep
Tyrosinkinase Phosphorylierungsregion	383-390	Prosite / Pep
N-Glycosylierungs- positionen (4)	26-29, 70-73, 221-224, 452-455	Prosite / Pep
cAMP und cGMP- abhängige Proteinkinase Phosphorylierungsstelle	199-202	Prosite / Pep

Tabelle 3.4 Modifikationspositionen im Dip-Protein. Vorhersagen der angegebenen Datenbanken über mögliche Modifikationspunkte und Proteindomänen im Dip-Protein. Die Datenbanken sind zu finden unter <http://www.expasy.org/tools/>. Stand: August 2003.

Abhängig vom verwendeten Algorithmus der jeweiligen Datenbank wurden verschiedene Regionen im Protein als besonders modifizierbar vorhergesagt. Die vorhergesagten Positionen sind teilweise überlappend, daher sind zur Absicherung der einzelnen Modifikationsstellen genauere Analysen nötig. Diese Übersicht dient der Verdeutlichung der vielen wahrscheinlichen Modifizierungsmöglichkeiten.

Die Datenbankrecherchen ergaben, daß Dip eine nukleäre Lokalisations-, eine GRAM- und mindestens zwei Transmembran-Domänen aufweist. GRAM-Domänen finden sich vor allem in membranassoziierten Proteinen wie Glykosyltransferasen oder Myotubuli. Dip ist möglicherweise in einer zellulären Membran lokalisiert. Die Analyse der Aminosäuresequenz von Dip mit der TargetP Sever v1.01 Datenbank, die die subzelluläre Lokalisation vorhersagt, ergab eine Wahrscheinlichkeit von 40% für die ersten 130 aminoterminalen Aminosäuren und eine Wahrscheinlichkeit von 76% für die Aminosäuren 375-500 für mitochondriale Lokalisation. Für die Aminosäuren 248-375 dagegen wurde eine 93%ige Wahrscheinlichkeit für die Lokalisation im sekretorischen Signaltransduktionsweg ermittelt.

3.3.1 Dip co-lokalisiert in den Mitochondrien

Um die Datenbankvorhersagen zu überprüfen, wurde die subzelluläre Lokalisation von Dip immunzytochemisch untersucht. Da keiner der beiden für Dip spezifischen Antikörper für die Immunfluoreszenz geeignet war, wurden Zellen mit His-markiertem Dip transfiziert. Die Lokalisation des Proteins wurde anschließend mit anti-His Antikörpern detektiert.

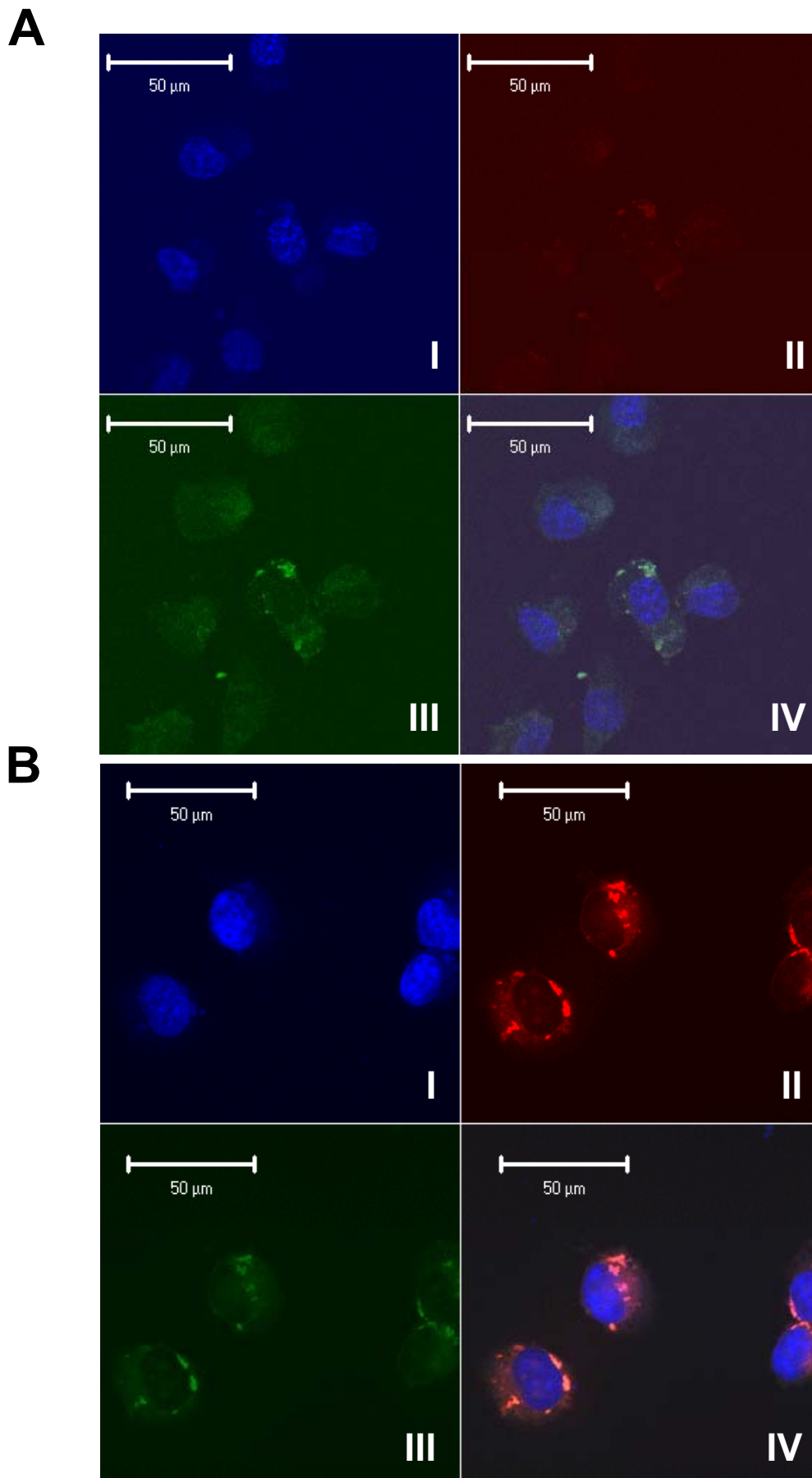


Abb. 3.24 Subzelluläre Lokalisation von Dip in H1299. A, pCDNA 3.1/ myc-His transfizierte H1299 Zellen; B, pCDNA 3.1/ myc-His.Dip transfizierte H1299 Zellen. I, DAPI Färbung; II, Anti-His/Alexa 546 Färbung; III, MitoTracker Green FM Färbung; IV, Überlagerungsbild. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion fixiert und angefärbt. 63fache Vergrößerung.

Die mitochondriale Lokalisation von Dip wurde durch Co-Färbung des Proteins mit dem Mitotracker Green FM Farbstoff nachgewiesen (Abb. 3.24). Fluoreszierende Mitotracker Green FM Farbstoffe diffundieren durch Zellmembranen und akkumulieren selektiv in den Mitochondrien von lebenden und fixierten Zellen (Poot et al., 1996).

3.3.2 Dip Protein-Expression wird durch E2F1-Aktivierung induziert

Neben der zellulären Lokalisation wurde die Expression des Dip Proteins in verschiedenem Gewebe bzw. verschiedenen Zelllinien analysiert. Hierzu wurde in verschiedenen asynchron wachsenden Tumor- und Primärzellen das Vorliegen von Dip-Transkripten mittels RT-PCR geprüft.

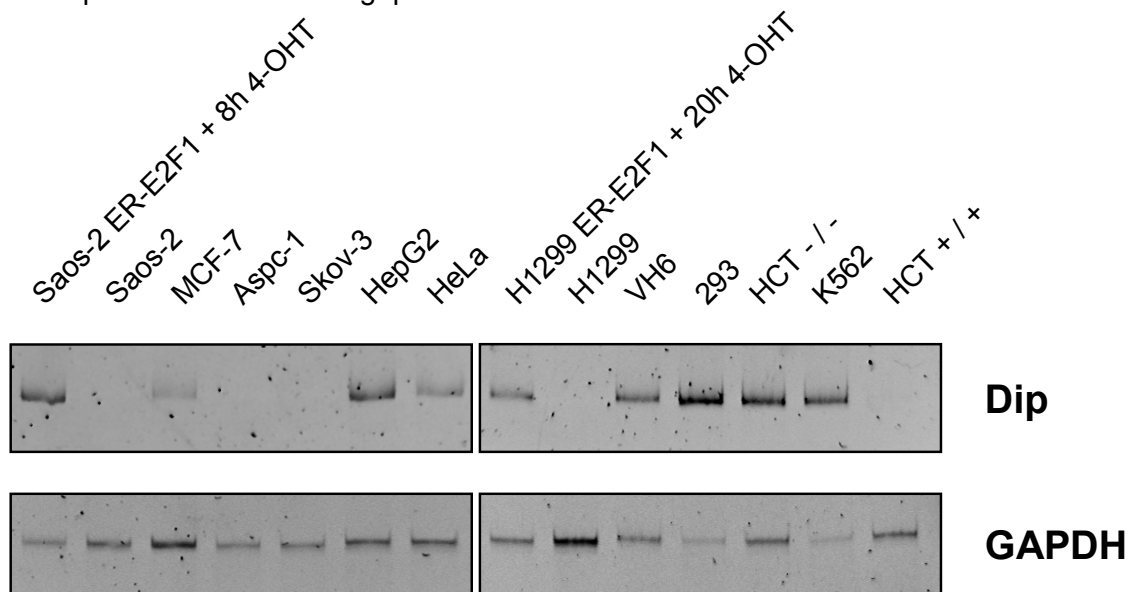


Abb. 3.25 Semi-quantitative RT-PCR von Dip in Tumor- und Primärzellen. Die angegebenen Zelllinien wurden auf Dip- und GAPDH-Transkripte analysiert. Gleiche RNA-Mengen wurden revers transkribiert und in PCR-Analysen unter linearen Bedingungen amplifiziert. H1299 ER-E2F1- und Saos-2 ER-E2F1-Zellen wurden für 20 h bzw. 8 h mit 4-OHT als Positivkontrolle induziert.

Dip war in den meisten Zelllinien kaum detektierbar, was die Funktion eines apoptotischen Proteins unterstützt. Die Dip-Expression konnte durch E2F1-Aktivität induziert werden (vgl. Spur 1 und 8 mit Spur 2 und 9; Abb. 3.25). Da vermehrte Dip mRNA-Transkriptlevel nicht zwangsläufig bedeuten, daß das Protein auch in den Zellen translatiert wird, wurde die Expression von Dip auf Proteinebene nach E2F1-Aktivierung überprüft.

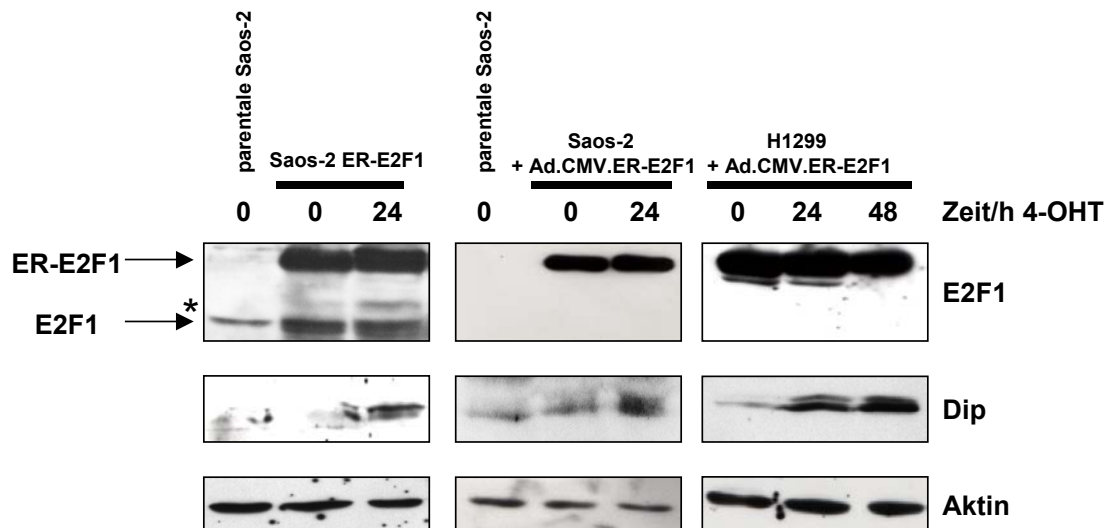


Abb. 3.26 Dip-Proteinlevel steigen durch E2F1-Aktivierung an. Zellen wurden 24 h nach ER-E2F1-Infektion (bei H1299 und Saos-2) oder bei Saos-2 ER-E2F1 24 h nach Serumentzug für die angegebenen Zeiten mit 4-OHT induziert. Gleiche Proteinmengen wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und die jeweiligen Proteine mit spezifischen E2F1, Dip oder Aktin Antikörpern detektiert.

Dip-Proteine stiegen nach E2F1-Aktivierung an. Dieser Anstieg korrelierte direkt mit der Menge an aktivierbarem E2F1 in den Zellen (Abb. 3.26). In H1299 und Saos-2 Zellen wurden nach Ad.CMV.ER-E2F1 Infektion sehr hohe Spiegel von ER-E2F1 detektiert. Diese hatten eine so starke Intensität, daß die ER-E2F1-Banden die Signale der endogenen E2F1-Level überstrahlten und daher endogenes E2F1 mit E2F1 Antikörpern nicht sichtbar gemacht werden konnte. In diesen Zellen waren ansteigende Dip Proteinspiegel am deutlichsten zu erkennen. In Saos-2 ER-E2F1-Zellen mußten sehr große Gesamtproteinmengen pro Spur aufgetragen werden, um ein Signal für Dip zu erreichen. In diesen Zellen war die Expression des chimeren ER-E2F1-Fusionsproteins am schwächsten im Vergleich zu adenoviral infizierten Saos-2 und H1299 Zellen. Denn endogenes E2F1 konnte hier detektiert werden, daher war die ER-E2F1-Expression schwächer als in den anderen Zellen.

Die meisten nachfolgenden Analysen wurden in H1299 durchgeführt, die adenoviral mit dem ER-E2F1-Transgen infiziert wurden. Daher wurde überprüft, ob nach Aktivierung des Fusionsproteins die Transaktivierung von typisch E2F1-regulierten 'targets' auch in diesem System möglich war.

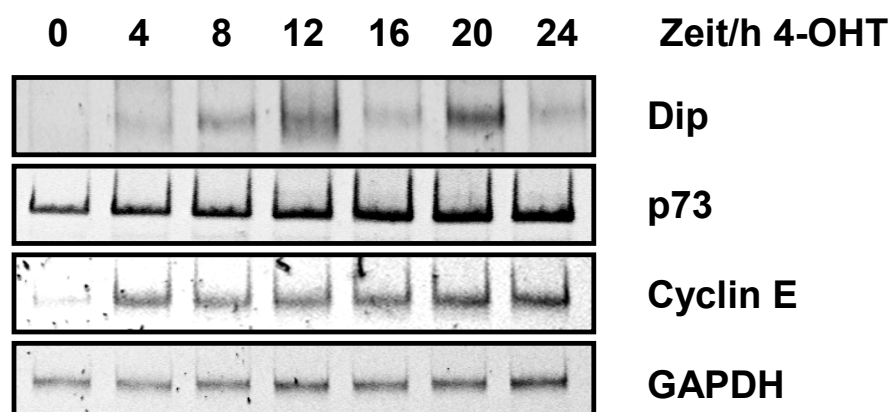


Abb. 3.27 Semi-quantitative RT-PCR in ER-E2F1-infizierten H1299 Zellen. H1299 Zellen wurden 24 h nach ER-E2F1-Infektion für die angegebenen Zeiten mit 1 μ M 4-OHT induziert und die aus diesen Zellen gewonnene RNA für RT-PCR Analysen eingesetzt.

Die typischen Transaktivierungen von Dip, p73 und Cyclin E nach E2F1-Translokation konnten in diesem System beobachtet werden (Abb. 3.27). Daher eignete es sich für weitere Analysen.

3.3.3 Dip ist an E2F1-induzierter Apoptose beteiligt

Da Dip transkriptionell und translationell durch E2F1 induziert wurde und die Dip-Überexpression zur Einleitung von Apoptose mit allen klassischen Merkmalen führte, lag die Vermutung nah, daß Dip an der E2F1-induzierten p53-unabhängigen Apoptose-induktion beteiligt ist. Zur Aufklärung dieser Funktionsweise wurde die Dip-Expression durch sog. '*small interfering*' RNAs (siRNAs) (Brummelkamp et al., 2002) unterdrückt. Hierbei hybridisieren die siRNAs mit den mRNA-Transkripten ihres Zielgens und diese siRNA-mRNA-Hybride werden degradiert. Durch diese Degradation unterbleibt die Translation und damit die Proteinexpression. Für diese sehr leistungsfähige Methode wurden adenovirale Vektoren konstruiert, die siRNAs gegen ein Sequenzmotiv im Exon 12 der Dip kodierenden Sequenz exprimieren. Zur Überprüfung der postulierten Effekte wurden H1299 Zellen mit ER-E2F1-exprimierenden Adenoviren und siRNAs gegen Dip bzw. GFP (Negativkontrolle) co-infiziert und 24 h nach Infektion das künstliche E2F1 aktiviert.

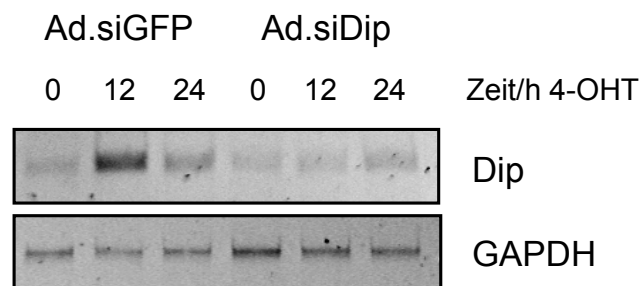


Abb. 3.28 RT-PCR an H1299 Zellen. H1299 Zellen wurden mit Ad.CMV.ER-E2F1 und Ad.siGFP bzw. Ad.siDip co-infiziert und 24h nach Infektion für 0, 12 und 24 h mit 4-OHT induziert. Die PCR wurde mit spezifischen Primern gegen GAPDH und Dip durchgeführt.

In ER-E2F1/siGFP co-infizierten Kontrollzellen wurde 12 und 24 h nach 4-OHT Gabe die typische Transaktivierung von Dip durch E2F1-Aktivierung beobachtet (Abb. 3.28). In ER-E2F1/siDip co-infizierten Zellen dagegen wurde durch spezifische Suppression kein Anstieg der Dip-Transkripte nach E2F1-Aktivierung beobachtet. Ein marginaler Anstieg von Dip mRNA wurde 24 h nach E2F1-Aktivierung durch 4-OHT beobachtet. Damit wurde die Unterdrückung der transaktivierenden Wirkung von E2F1 auf die Dip-Transkription hier gezeigt.

Anschließend wurden die Auswirkungen der Dip-Suppression auf die E2F1-vermittelte Apoptose untersucht. Hierzu wurden Zellen mit den siRNAs und ER-E2F1 co-infiziert und nach E2F1-Aktivierung die unterschiedlichen Ausmaße der Apoptoseinduktion im Durchflusszytometer und die Anzahl überlebender Zellen im sog. Colony Assay gemessen.

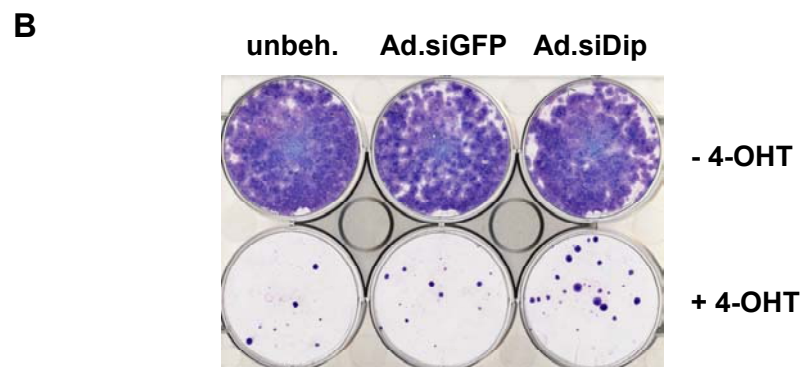
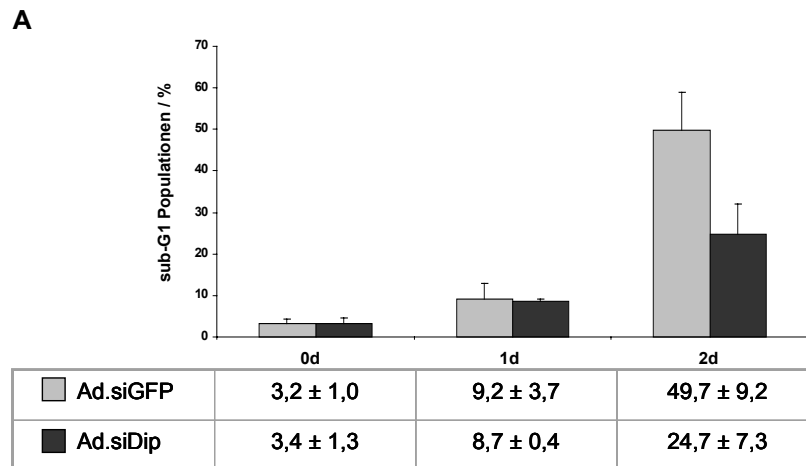


Abb. 3.29 Verminderte Apoptoseinduktion durch siRNAs gegen Dip in H1299 Zellen. H1299 Zellen wurden mit (A) Ad.CMV.ER-E2F1 und Ad.siGFP bzw. Ad.siDip co-infiziert und 24 h nach Infektion für 0, 24 und 48 h mit 4-OHT induziert. Nach Fixierung wurden die Zellen im FACS nach PI-Färbung auf sub-G1 Populationen analysiert. Der prozentuale Anteil der sub-G1 Population am Gesamtzellprofil aus zwei unabhängigen Experimenten ist hier als Balkendiagramm dargestellt. (B) Colony Assay in H1299 ER-E2F1-Zellen nach siDip bzw. siGFP Infektion. Zellen wurden mit 4-OHT induziert und 14 Tage nach Induktion fixiert und gefärbt.

22 überlebende Zellkolonien waren in siDip-infizierten Zellen gegenüber acht Zellkolonien in unbehandelten Zellen und zwölf Kolonien in siGFP Kontrollvirus-infizierten Zellen zu beobachten (Abb. 3.29.B). Die FACS-Daten zeigten eine 50%ige Abnahme (49,7% in siGFP- gegenüber 24,7% in siDip-infizierten Zellen) E2F1-induzierter Apoptose bei unterdrückter Dip-Expression 48 h nach E2F1-Aktivierung (Abb. 3.29.A). Daher wird durch Dip-Unterdrückung die Apoptoseeinleitung teilweise gestört.

3.3.4 Dip-Promotorkonstrukte sind nicht durch E2F1 aktivierbar

Die bisherigen Untersuchungen zur Regulation der Dip-Expression deuteten auf eine direkte Transaktivierung durch E2F1 hin (vgl. Abb. 3.9). Zur genaueren Analyse dieses Mechanismus wurden Dip-Promotorfragmente (Abb. 3.30) vor das Luciferasereporter gen kloniert und deren Aktivierbarkeit durch E2F1-Expression überprüft. In diesem Assay wurde geprüft, ob mögliche Dip-Promotorregionen durch E2F1 besetzt werden. Die Interaktion der DNA-Promotorregion mit dem Transkriptionsfaktor E2F1 führt zur Initiation der Transkription des Luciferasegens. Die Stärke der Transkription führt direkt proportional zur Freisetzung des 'firefly luciferase' Proteins. Dieses 61 kDa Protein katalysiert in der Assayreaktion die Luciferin Oxidation, bei der chemische Energie in Lichtimpulse umgewandelt wird. Diese meßbaren Lichtsignale korrelieren mit der Intensität der Aktivierbarkeit des untersuchten Promotorfragmentes.

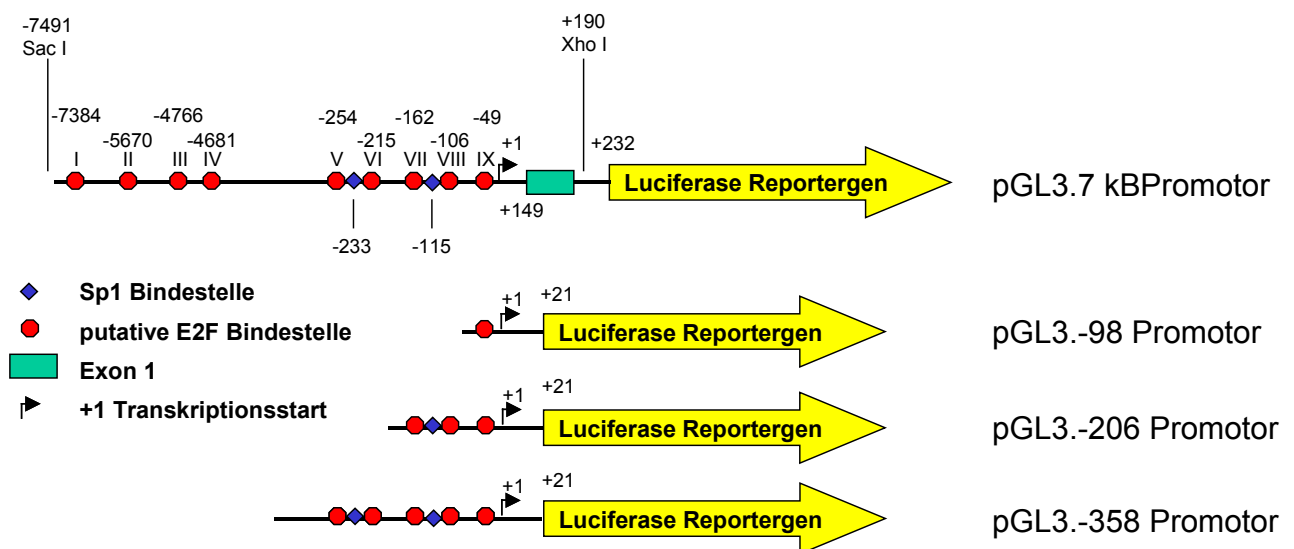


Abb. 3.30 Schematische Übersicht der verwendeten Promotorkonstrukte. Mögliche E2F-Bindungsstellen sind als rote Sechsecke dargestellt. E2F-Bindungsstellen 5'→3' : I, TTGGCGC; II, CCGGCAA; III, TTGGCGC; IV, CGGGAA; V, AAGGGCC; VI, CGGGGTT; VII, GGGGCTT; VIII, CGGGGTT; IX, GGGGCTT. Sp1-Bindungsstellen sind als blaue Rauten dargestellt. Erste Sp1-Bindungsstelle (-233), GGGCGGGG; Zweite Sp1-Bindungsstelle (-115), GGGCGGGG. Die Positionen der einzelnen Bindungsstellen bzw. Restriktionsstellen und Beginn des Exons 1 sind in Relation zum Transkriptionsstart (+1) angegeben.

In vielen E2F-regulierten Promotoren sind keine regulatorischen Elemente wie TATA-box zu finden, dafür haben solche Promotoren oft GC-reiche Sequenzen und Sp1 Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen (Kel et al., 2001). In der Nähe des kodierenden Bereichs des Dip-Gens befindet sich keine TATA-Box, dafür sind aber zwei Sp1-Bindungsstellen vorhanden. In der direkt 5'-stromaufwärts liegenden Region des Transkriptionsstarts befinden sich fünf mögliche E2F-Bindungsstellen. Die Sequenzen der E2F-Bindungsstellen VI, VII, VIII und IX weichen in einer Base von der akzeptierten Konsensus-Sequenz [T T (C/G) (C/G) C G (C/G)] ab. Da jedoch auch in anderen Studien von dieser Sequenz abweichende E2F-Bindungsstellen gefunden wurden (Gao et al., 2003; Furukawa et al. 2002), wurden diese Bindungsstellen dennoch als mögliche

E2F1-interagierende Regionen in Betracht gezogen. Zwischen 7,3 und 4,6 kb '*upstream*' vom Transkriptionsstart liegen vier weitere putative E2F-Bindungsstellen, die der Konsensus-Sequenz entsprechen. Die mögliche Regulation des Luciferasegens über alle diese Interaktionspositionen wurde durch Co-Transfektionsanalysen von E2F1-Expressionsplamiden im Überschuß zum Promotorkonstrukt überprüft.

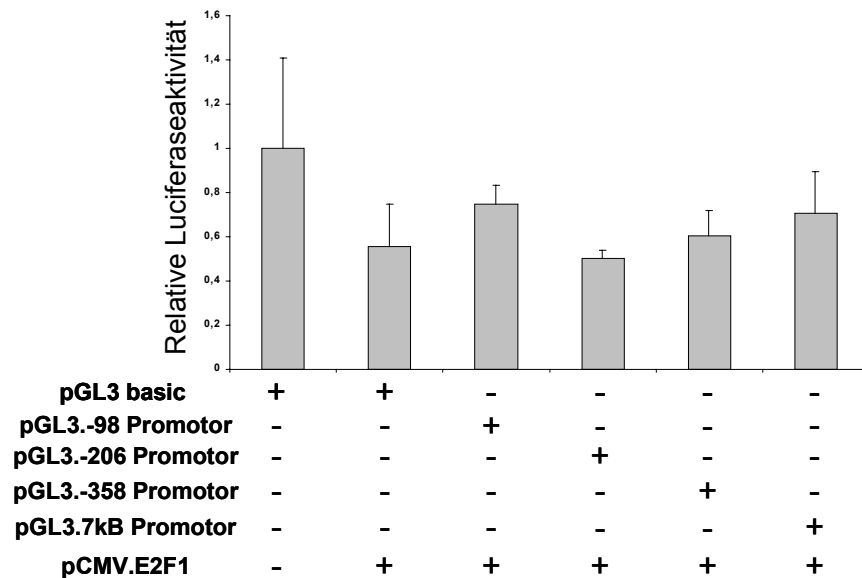
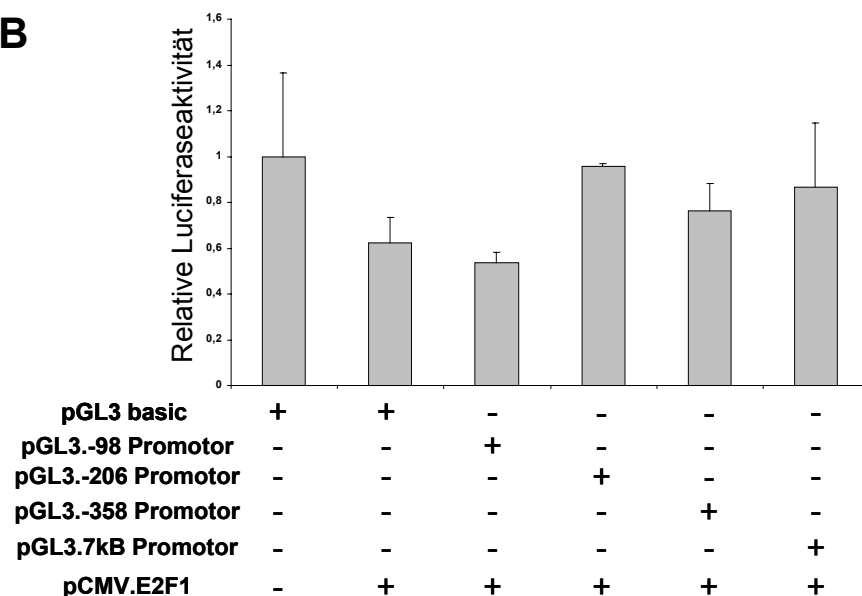
A**B**

Abb. 3.31 Luciferase Assay von Dip-Promotorkonstrukten. 3 µg E2F1-Plasmid und 0,5 µg jeweiliges Promotorkonstrukt wurden in H1299 (A) und Saos-2 (B) Zellen im Doppelansatz transfiziert. Die relativen Luciferaseaktivitäten wurden auf die Aktivitäten von pGL3 basic normalisiert. Ein typisches von mindestens zwei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

In beiden Zelllinien (H1299 und Saos-2) wurde keines der Promotorkonstrukte durch E2F1-Überexpression über die basale Luciferaseaktivität des pGL3 Basic-Kontrollkonstruktes hinaus aktiviert (Abb. 3.31). Die gemessenen Luciferaseaktivitäten der Promotorkonstrukte lagen in allen Ansätzen unterhalb der normierten Aktivität des

Kontrollansatzes von eins. Eine ausreichende Transduktion der Zellen mit E2F1 wurde in den verwendeten Extrakten überprüft. Daher ist der Dip-Promotor nicht durch E2F1 aktivierbar. Die Dip-Expression wird deshalb nicht direkt durch E2F1 induziert.

3.3.5 Dip ist durch p73 β , aber nicht durch p73 α oder p53 induzierbar

Bekannte E2F1-regulierte pro-apoptotische Gene wie p73 und Apaf-1 werden auch durch p53 aktiviert und haben p53-Bindungsstellen in ihren Promotoren (Stiewe und Pützer, 2000; Moroni et al., 2001). Ob das E2F1-regulierte pro-apoptotische Dip ebenfalls durch p53 oder den p53-homologen Faktor p73 induziert wird, wurde nach Transduktion dieser Faktoren untersucht. p73 wird in mehreren Isoformen in Zellen exprimiert (Stiewe und Pützer 2001). Die beiden größten Isoformen α und β sind beide in der Lage als Transkriptionsfaktoren über die Bindung an p53-regulierte Gene Apoptose zu induzieren (Jost et al., 1997; Ishida et al., 2000). Daher wäre eine Aktivierung von Dip durch diese Faktoren als zusätzlicher pro-apoptotischer Signalweg vorstellbar. Der Einfluß dieser Tumorsuppressoren auf die Dip-Expression wurde nach adenoviraler Infektion von p53, p73 α und p73 β untersucht.

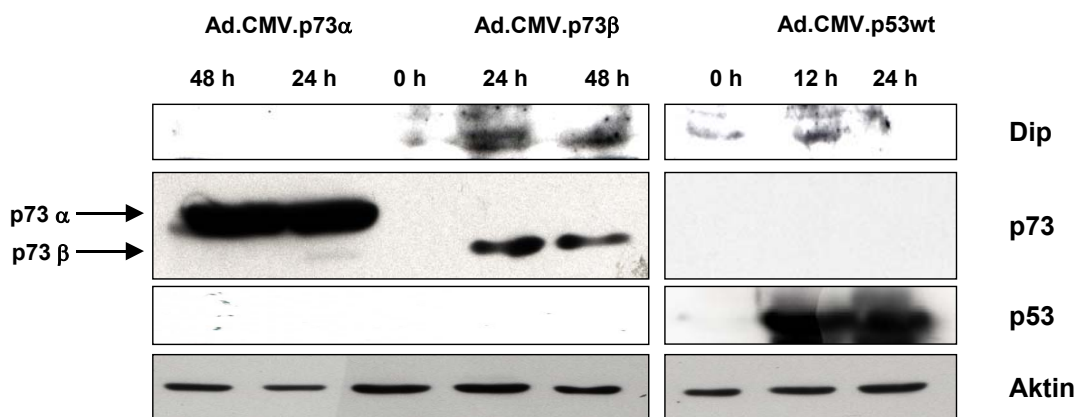


Abb. 3.32 Western Blot in H1299 Zellen nach Ad.CMVp73 α , Ad.CMV.p73 β und Ad.CMV.p53wt Infektion. Gesamtzellextrakte infizierter Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, und die jeweiligen Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Die Expression der jeweiligen Transgene war 12 bis 24 h nach adenoviraler Infektion nachweisbar. Ad.CMV.p73 β induzierte Dip bereits 24 h nach der Infektion. Die andere p73-Isoform p73 α induzierte trotz stärkerer Expression des Transgens keine Dip-Expression. Die Infektion mit Ad.CMV.p53wt führte nicht zur Dip-Induktion (Abb. 3.32).

3.3.6 E2F1 induziert Cytochrom c und die Dip-Freisetzung aus den Mitochondrien

Ein wichtiger Bestandteil der E2F1-vermittelten Apoptose ist der E2F1/Apaf-1/Caspase 9 Signaltransduktionsweg. E2F1 transaktiviert Apaf-1 direkt. Dieser Faktor assoziiert mit freigesetztem Cytochrom c. Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol ist ein häufig beschriebenes Ereignis, das auf erhöhte E2F1-Aktivität

zurückzuführen ist. Bei E2F1-induzierter Apoptose wurde die Freisetzung von Cytochrom c bisher nur in p53-positiven Zellen beobachtet (Moroni et al., 2001; Furukawa et al., 2002). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Freisetzung von Cytochrom c über E2F1 auch in p53-negativen Zellen ausgelöst werden kann, und ob Dip an diesem Mechanismus beteiligt ist, d.h. inwieweit die subzelluläre Lokalisation von Dip im Rahmen der E2F1-induzierten Apoptose beeinflusst wird.

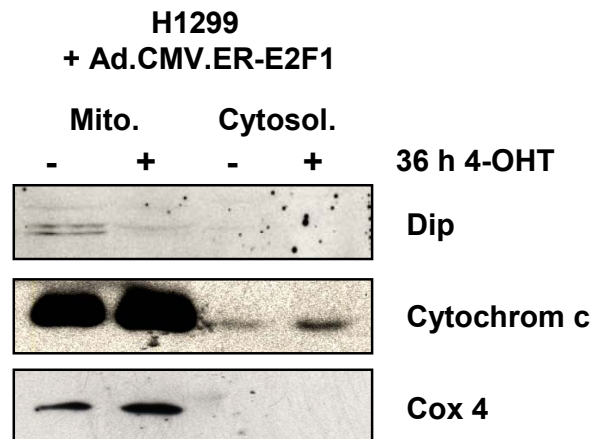


Abb. 3.33 Zellkompartimentfraktionierung. p53-negative H1299 Zellen wurden mit Ad.CMV.ER-E2F1 infiziert und 36 hpi für 36 h mit Ethanol (Spur 1 & 3) oder 4-OHT (Spur 2 & 4) induziert. Mitochondriale und cytosolische Protein-extrakte wurden mit dem ApoAlert Kit isoliert, und gleiche Proteinmengen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Protein-Expression wurde mit spezifischen Antikörpern gegen Dip, Cytochrom c oder den mitochondrialen Marker Cox 4 detektiert.

Nach E2F1-Induktion wurde eine Zunahme von Cytochrom c im Cytosol beobachtet (Abb. 3.33; Spur 4). Dieses Ergebnis war auf die Freisetzung dieses mitochondrienständigen Faktors und nicht auf Verunreinigung der cytosolischen Fraktion durch Mitochondrien zurückzuführen, da die cytosolischen Extrakte kein mitochondriales Markerprotein Cox4 aufwiesen. Die Proteinbanden des mitochondrial lokalisierten Dip nahmen nach E2F1-Induktion signifikant in ihrer Intensität ab (Abb. 3.33, Spur 2). Dieser Effekt ist ein Hinweis für die Ausschleusung dieses Proteins aus den Mitochondrien nach E2F1-Induktion. Da anschließend keine Proteinbanden von Dip im Cytosol nachweisbar waren, bleibt der Aufenthaltsort von Dip nach E2F1-Induktion zu diskutieren.

4 DISKUSSION

Die Familie der E2F Transkriptionsfaktoren nimmt eine zentrale Rolle bei der Zellproliferationsregulation ein. E2Fs kontrollieren die Genexpression von Proteinen, die an der Zellzyklusprogression und DNA-Synthese beteiligt sind, aber auch von Genen, die bei der Apoptose relevant sind. E2Fs werden zellzyklusabhängig durch Interaktion mit 'pocket' Proteinen reguliert, die wiederum durch Cyclin-abhängige Kinasen und deren Inhibitoren streng in ihrer Aktivität kontrolliert werden, was die Bedeutung dieser Proteine für die zelluläre Integrität unterstreicht (Sherr, 1996; Dyson, 1998).

Verschiedenen E2F-Proteinen konnten unterschiedliche Funktionen für den Zellzyklus oder den programmierten Zelltod zugeordnet werden. E2F1 aktiviert einerseits Zellen zum Eintritt in den Zellzyklus (Johnson et al., 1993), andererseits induziert es Apoptose (DeGregori et al., 1997). E2F1 steht im Vordergrund der meisten Analysen, da gerade sein dualer Einfluß auf die Regulation der gegensätzlichen Prozesse von Proliferation und Apoptose darlegt, wie eng das Zusammenspiel verschiedenster zellulärer Prozesse ist.

4.1 E2F1 reguliert eine Vielzahl von Genen

Die Rolle von E2F1 für die Zellzykluskontrolle und Apoptoseinduktion wird anhand der Fülle von Studien deutlich (Qin et al., 1994; Kowalik et al., 1995; DeGregori et al., 1997). Die molekularen Zusammenhänge der E2F1-induzierten Apoptose sind nur teilweise aufgeklärt, und insbesondere für die p53-unabhängige Apoptose werden immer wieder neue Faktoren beschrieben (Susin et al., 1999; Stiewe und Pützer, 2000; Müller et al., 2001; Nahle et al., 2002; Polager et al., 2002; Stanelle et al., 2002). Durch die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms und der damit verbundenen Erkenntnis über die Anzahl und Lokalisation der meisten kodierenden Gensequenzen erlangen Untersuchungen, die auf der DNA-Mikroarraytechnologie beruhen, große Bedeutung. Solche Arrays mit einer großen Anzahl von Gensequenzen ermöglichen die gleichzeitige Untersuchung von sehr vielen Genen bzw. deren Expressionsmustern nach Abänderung des zellulären Gleichgewichts z.B. durch Aktivierung eines bestimmten Faktors. So sind in den letzten Jahren mehrere Studien zur Identifizierung neuer E2F-regulierter Gene/Faktoren erschienen, die alle das Expressionsmuster von Zielgenen nach E2F-Aktivierung untersucht haben (Ishida et al., 2001; Kel et al., 2001; Müller et al., 2001; Weinmann et al., 2001; Ma et al., 2002; Polager et al., 2002).

Um p53-unabhängige Apoptosegene zu identifizieren, wurden in dieser Arbeit Zellsysteme verwendet, die ein chimeres E2F1-Fusionsprotein konstitutiv exprimieren. Dieses Fusionsprotein besteht aus einem durch 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT)-regulierbaren Teil des murinen Östrogenrezeptors (ER) (Littlewood et al., 1995) und dem Wildtyp E2F1-Protein. In solchen Zellsystemen sollte wie in Abbildung 3.1 postuliert das Fusionsprotein nach 4-OHT-Induktion in den Zellkern translozieren und E2F1-responsive

Gene transaktivieren. Hierzu zählen Gene der DNA-Replikation z.B. die Dihydrofolatreduktase und der Zellzykluskontrolle z.B. Cyclin E (Ohtani et al., 1995; Slansky und Farnham, 1996), aber auch pro-apoptotische Zielgene wie p73 (Irwin et al., 2000; Stiewe und Pützer, 2000). Die korrekte Translokation des Fusionsproteins vom Cytoplasma in den Zellkern konnte in beiden verwendeten Zelllinien gezeigt werden. Das ER-E2F1-Fusionsprotein wurde exklusiv in den modifizierten Saos-2 ER-E2F1- und H1299 ER-E2F1-Zellen detektiert und war in den parental Zellen erwartungsgemäß abwesend. Die Transaktivierung bekannter E2F1-Zielgene, p73 und Cyclin E, wurde gezeigt. GAPDH war als Standard zur Kontrolle der RT-PCR-Reaktion und als Ladekontrolle geeignet, weil keine Veränderung der mRNA-Level nach E2F1-Induktion beobachtet werden konnte (vgl. auch Stiewe und Pützer, 2000). Somit waren beide Zelllinien für weitere Untersuchungen verwendbar.

Durch die Aktivierung des ER-E2F1-Fusionsproteins entsteht ein Zustand deregulierter E2F1-Aktivität. Die daraus resultierende Einleitung von Apoptose ist in der Literatur ausgiebig beschrieben (Wu und Levine, 1994; Kowalik et al., 1995). Durch Apoptoseinduktion wird die sog. Caspase-Todessignalkaskade aktiviert. Der Apoptose-Stimulus wird dabei durch sukzessive Aktivierung von proteolytischen Pro-Caspasen und deren Spaltung weitergeleitet (Rathmell und Thompson, 1999). Am Ende dieser Kaskade werden zelluläre Substrate wie DFF45 (*'DNA fragmentation factor 45 kDa'*) oder die Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) durch Spaltung deaktiviert. Die Aktivierung dieses Enzyms als Folge der E2F1-Aktivierung konnte für beide ER-E2F1-Zelllinien gezeigt werden. Der Nachweis der Funktionalität der verwendeten Zelllinien war damit erbracht und die Zelllinien konnten für weitere Analysen eingesetzt werden.

Die E2F1-induzierte Apoptose wird über p53-abhängige Apoptose-Signalkaskaden (Qin et al., 1994; Wu und Levine, 1994; Pierce et al., 1998a) vermittelt, aber auch über Netzwerke, die unabhängig von p53 Apoptose auslösen (Philips et al., 1997; Holmberg et al., 1998). So konnte p73 kürzlich als direktes E2F1-Zielgen identifiziert werden, über das E2F1 unabhängig von p53 Apoptose induziert (Irwin et al., 2000; Stiewe und Pützer, 2000). Zur Identifizierung neuer E2F1-regulierter p53-unabhängiger pro-apoptotischer Faktoren wurde ein DNA-Mikroarray eingesetzt. Dieses Mikroarray wurde mit Hybridisierungssonden hybridisiert, die aus den p53-negativen Saos-2 ER-E2F1-Zellen hergestellt worden waren. Nach 8stündiger E2F1-Induktion wurde bereits die höchste Aktivierung von p73 mRNA beobachtet. Daher wurde dieser Zeitpunkt für die Generierung der Hybridisierungssonden gewählt. Das Kontrollarray wurde mit Hybridisierungssonden aus Zellen hybridisiert, die nicht durch 4-OHT induziert worden waren. Die Saos-2 ER-E2F1-Zellen wurden den H1299 ER-E2F1-Zellen vorgezogen, weil die induktiven Effekte auf die Zielgene hier insgesamt ausgeprägter waren.

Durch die Induktion von E2F1 wurde die Expression einer Vielzahl von Genen auf dem Mikroarray verändert. Dennoch muß davon ausgegangen werden, daß E2F1 nicht alle veränderten Gene reguliert. Daher wurde, um falsch positive Kandidatengene auszuklammern, ein Schwellenwert von 2facher Aktivierung festgelegt. 470 (=5,5%) der 8400 Gensequenzen wurden oberhalb des Schwellenwertes als durch E2F1 aktiviert gefunden (siehe Anhang). Der Schwellenwert wurde durch unabhängige RT-PCR Verifizierung validiert. Hierzu wurde eine zufällige Stichprobe von 30 Zielgenen gewählt. 24 dieser 30 Gene (=80%) konnten als tatsächlich durch E2F1-induziert identifiziert werden. Kein Zielgen unterhalb des Schwellenwertes konnte in RT-PCR Experimenten bestätigt werden. Ein weiteres Qualitätsmerkmal für die Mikroarray-Daten ist die Tatsache, daß vier bisher als E2F1-reguliert beschriebene Gene (Cyclin D, Cyclin E1, Cyclin E2 und MAP3K5) ebenfalls durch E2F1-induziert und als oberhalb des Schwellenwertes identifiziert wurden. Weiterhin war positiv, daß das Ausmaß der Aktivierung einzelner Gene im Array mit der Intensität der RT-PCR Untersuchungen korrelierte. So zeigten Gene mit deutlicher Induktion wie MMP16 oder KIAA0767 auch deutlich ansteigende Banden in den RT-PCR Verifizierungsexperimenten.

Die Induktion der Zielgene durch E2F1 wurde auch in primären Zellen untersucht und bestätigt. Die transaktivierenden Effekte auf die neuen E2F1-Zielgene wurden durch Aktivierung des Fusionsproteins ausgelöst. Daher wurde überprüft, ob endogenes E2F1 die gleichen Effekte auslösen kann. Endogenes E2F1 wurde in Zellen nach Serumentzug durch 15%ige FCS-Induktion aktiviert. Die FCS-Induktion führt zur Aufhebung der zellulären Arretierung durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie E2F1. Daher ist die beobachtete Aktivierung von Zielgenen nach FCS-Induktion ein Hinweis auf Transaktivierung durch endogenes E2F1. Dennoch bleibt zu bedenken, daß diese Analyse nur ein Hinweis und kein Beweis endogener E2F1-Transaktivierung ist, da die FCS-Induktion nicht nur selektiv endogenes E2F1, sondern auch eine Vielzahl anderer Transkriptionsfaktoren wie c-Myc aktiviert, die ebenfalls die detektierte Transaktivierung ausgelöst haben könnten. Zur genaueren Charakterisierung des Regulationsmechanismus wurden zuvor positiv getestete neue E2F1-regulierte Zielgene in Anwesenheit von Cycloheximid (CHX) induziert. Gene, die in Anwesenheit dieses Proteinsyntheseinhibitors aktiviert werden können, werden durch E2F1-Aktivität alleine transaktiviert und benötigen keine weiteren Proteine für deren Transaktivierung. Solche Gene jedoch, die keine Aktivierung in Gegenwart von CHX und 4-OHT (=E2F1-Aktivität) im Vergleich zu CHX oder unbehandelten Zellen alleine zeigen, werden indirekt durch E2F1 transaktiviert. In Tabelle 3.2 wurden die Ergebnisse aller Verifizierungsexperimente zusammengestellt und die E2F1-regulierten Gene nach ihrer Funktion klassifiziert.

Wie zu erwarten hat E2F1 einen Einfluß auf viele verschiedene zelluläre Faktoren. Hierzu zählen Gene der Zellzykluskontrolle, Gene, die für die Apoptoseregulation relevant sind,

aber auch Gene die in die Tumorigenese involviert sind. Da in dieser Arbeit neue pro-apoptotische Gene identifiziert werden sollten, erschienen solche Gene, die besonders stark durch E2F1 transaktiviert werden, besonders aussichtsreich. Davon ausgehend, daß apoptotische Proteine unter normalen Bedingungen nicht oder nur sehr schwach in Zellen exprimiert werden, sollten sie unter deregulierten E2F1-Bedingungen sprunghaft und sehr ausgeprägt ansteigen. Die Analyse der Gene mit bislang unbekannter Funktion war besonders attraktiv. KIAA0455 und KIAA0767 (Funktion unbekannt) zeigten eine signifikante 13fache Aktivierung durch E2F1. Müller et al. (2001) führten Array-Studien mit ER-E2F1 in p53-positiven Osteosarkom U2OS Zellen durch und fanden KIAA0717 nach Aktivierung von E2F1 14,7fach erhöht. Nach Verifizierung dieses Gens im Saos-2 ER-E2F1-System wurden KIAA0455, KIAA0717 und KIAA0767 auf deren apoptotische Funktion hin analysiert.

4.2 Untersuchungen neuer E2F1-regulierter Gene auf pro-apoptotische Funktionen

Die Vollängenklonierungen und *in vitro* Translationen der drei KIAA-Genprodukte resultierten in eindeutigen Banden von Proteinhauptprodukten. KIAA0455 zeigte zusätzlich zum Hauptprodukt noch zwei weitere Banden, die vermutlich durch unkorrekte Termination der Translation über den kodierenden Leserahmen hinaus entstanden sind.

Die Überexpression der Proteine nach adenoviralem Gentransfer hatte unterschiedlichen Einfluß auf die Zellvitalität von fünf untersuchten Zelllinien. KIAA0767 reduzierte die Anzahl überlebender Zellen in allen Systemen am stärksten, während KIAA0455 den geringsten und KIAA0717 einen mittleren Einfluß auf die Zellvitalität hatten. Der Einfluß von KIAA0767 auf die Anzahl überlebender Zellen im MTT-Assay entsprach dem des Tumorsuppressors p53. In normalen Fibroblasten war KIAA0767 als einziges Protein in der Lage die Zellzahl nach 4tägiger Überexpression signifikant zu vermindern. Die Zellzahl der jeweils infizierten Zellen wurde im Verhältnis zu GFP-infizierten Zellen ermittelt. Eine Reduktion der Zellvitalität hätte daher durch verschiedene Ursachen hervorgerufen worden sein können. Zellen, die durch Toxizität, Nekrose oder Apoptose abgestorben waren, hätten eine verminderte Zellzahl gehabt. Allerdings wären auch Zellen, die durch langsames Wachstum eine geringere Zellzahl aufwiesen, als scheinbar absterbende Zellen identifiziert worden. Um daher die Ursache verminderter Zellzahlen aufzuklären, wurden die Zellzyklusprofile von infizierten Zellen analysiert. Da das Ziel der funktionellen Assays die Identifizierung eines neuen potenten pro-apoptotischen Gens war, wurde die Analyse des schwächsten Faktors KIAA0455 nicht weiter verfolgt.

Die FACS-Analysen konnten die in den MTT-Assays beobachteten Effekte bestätigen. KIAA0717-infizierte Zellen zeigten einen deutlich Anstieg von Zellen in der G2/M-Phase,

der vermutlich durch eine Arretierung im Zellzyklus hervorgerufen wurde. Anschließend erhöhte sich die Population an sub-G1 Phase Zellen als ein typisches Zeichen für apoptotische Zellen. Die KIAA0717-exprimierenden Zellen schienen sich in ihrer Anzahl zu vermindern, obwohl sie tatsächlich langsamer wuchsen und erst sekundär durch Apoptose abstarben. KIAA0767-infizierte Zellen zeigten eine sukzessive Abnahme von G1-Phase Zellen mit einem gleichzeitigen Anstieg von Zellen in der sub-G1 Phase als Hinweis für apoptotischen Zelltod. Die Zellzahlreduktion war daher wie bei p53-infizierten Zellen auf Apoptoseeinleitung zurückzuführen. KIAA0767-induzierte Apoptose verlief allerdings zeitlich langsamer als p53-vermittelte Apoptose.

Ein typisches Anzeichen von Apoptoseinduktion ist das Auftreten von biochemischen und morphologischen Veränderungen in Zellen. Hierzu zählt das Aufblähen von Membranen, das Zellschrumpfen, der nukleäre Kollaps, die zelluläre Fragmentierung in '*apoptotic bodies*' und die nukleosomale Fragmentierung von genomischer DNA (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980; Wyllie, 1980). Durch Hoechst/PI-Färbungen wurden solche Veränderungen sichtbar gemacht. Die Ergebnisse der FACS-Daten wurden hier bestätigt. KIAA0717-infizierte Zellen wuchsen durch G2/M-Phase-Arrest langsamer als GFP-infizierte Zellen und zeigten dann apoptotische Zellen. KIAA0767-infizierte Zellen lösten sich wie p53-infizierte Zellen vom Untergrund ab, wobei aufgeblähte Membranen und Zellkerne mit apoptotischen Körpern detektierbar waren. Da nach KIAA0767-Überexpression die meisten klassischen Apoptosemerkmale nachweisbar waren, wurde nur dieses Protein weiteren funktionellen Tests unterzogen. Apoptose-Stimuli werden wie bereits beschrieben durch Caspase-Todessignalkaskaden weitergeleitet und führen zeitlich nach der PARP-Spaltung zur Degradation von chromosomaler DNA in nukleosomale DNA-Einheiten. Die Detektion dieser Fragmente ist der klassischste Nachweis apoptotischer Zellen. Die sog. DNA '*ladder*' fragmentierter Nukleinsäuren und die PARP-Spaltung als typisches Substrat der Todessignaltransduktionskaskade konnte nach KIAA0767-Überexpression identifiziert werden. KIAA0767-Überexpression führte daher wie p53-Überexpression zur Apoptoseinduktion. Die Ergebnisse der Funktionstests der drei KIAA-Genprodukte sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

	KIAA0455	KIAA0717	KIAA0767
MTT Assays	Schwach reduzierender Effekt auf die Zellvitalität	Mittelstark reduzierender Effekt auf die Zellvitalität	Stark reduzierender Effekt auf die Zellvitalität
FACS	Nicht untersucht	G2/M-Arretierung, dann sub-G1 Anstieg	Sub-G1 Populationen
Zell-Morphologie	Nicht untersucht	Langsameres Wachstum, dann apoptotische Zellen	Apoptotische Zellen
DNA '<i>ladder</i>'	Nicht untersucht	Nicht untersucht	Nukleosomale DNA-Einheiten
PARP-Spaltung	Nicht untersucht	Nicht untersucht	PARP-Spaltung durch Apoptoseind.

Tabelle 4.1 Ergebnisse der Testassays. Übersicht der Ergebnisse der funktionellen Analysen.

KIAA0767 wurde abgeleitet aus seiner Funktion als Dip für '*death inducing protein*' benannt.

4.3 KIAA0767/Dip: ein effektiver Mediator E2F1-induzierter Apoptose

Dip besitzt die klassischen Eigenschaften eines pro-apoptotischen Proteins. In asynchron wachsenden Tumor- und normalen Zellen konnten Dip-Proteine nicht detektiert werden. Die Existenz von unterschiedlich ausgeprägten mRNA-Leveln läßt nicht zwingend auf die Proteinmengen rückschließen. Dennoch bedeuten höhere mRNA-Level, daß die Proteinexpression schneller und ausgeprägter ablaufen sollte als in Zellen in denen transkriptionell erst mRNA produziert werden muß. Allerdings führte die Aktivierung von ER-E2F1 in H1299 und Saos-2 Zellen bereits nach 24 Stunden zur Detektion von Dip-Proteinen, obwohl in beiden parental Zellen keine Dip mRNA detektiert wurde. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß Dip-Proteine sich mit zwei spezifischen Proteinbanden detektieren ließen, wenn sie endogen durch E2F1 als 'upstream'-Aktivator induziert wurden, aber vier spezifische Proteinbanden beobachtet wurden, wenn das Protein durch adenoviralen Gentransfer überexprimiert wurde. Proteindatenbank-recherchen haben deutlich gemacht, daß eine sehr große Anzahl von Modifikationsstellen im Dip-Protein existieren. So wurden neben mindestens zwei Transmembran-Domänen und einer GRAM-Domäne, typisch für membranassoziierte Proteine, auch mehrere Myristoylierungsstellen und sehr viele mögliche Phosphorylierungsstellen gefunden (vgl. Tabelle 3.4). Da die Datenbanken Modifikationsdomänen mit Hilfe von Algorithmen auffinden, die auf Informationen aus anderen Proteinen aufbauen, sind sicherlich nicht alle Domänen treffend vorausgesagt. Dennoch existieren mehrere Regionen für mögliche post-translationale Modifikationen im Protein. Glycosylierungen und Phosphorylierungen des Proteins führen zu mehreren unterschiedlichen Proteinformen mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Diese Proteinisoformen wurden durch zwei bzw. vier Banden detektiert. Die vier beobachteten Proteinbanden zwischen 50 und 64 kDa nach adenoviraler Infektion können darauf beruhen, daß das exogene Dip durch die sehr starke Aktivität des CMV-Promotors in so großen Mengen produziert wird, daß die Kapazität der zellulären Mechanismen, die an der post-translationalen Modifikation des Proteins beteiligt sind, überlastet ist. Daher könnte es, anders als bei koordinierter post-translationaler Modifikation des endogenen Dip nach E2F1-Aktivität, neben den zwei Haupt-Proteinformen noch zur Existenz weiterer Proteinisoformen kommen. Diese zusätzlichen Proteinformen könnten Zwischenstufen darstellen oder aber durch mangelnde zelluläre Koordination auch unsinnig modifizierte Proteine sein. Es kann ausgeschlossen werden, daß die beobachteten Proteinbanden auf Effekte der Virusinfektion zurückzuführen sind, da das gleiche Bandenmuster (vier Banden) beobachtet wurde, wenn Zellen mit dem Dip-Vollängenkonstrukt unter CMV-Promotor-Kontrolle in einem Expressionsplasmid transfiziert wurden. Die Aufklärung der tatsächlich vorhandenen Proteinisoformen kann

zukünftig vielleicht durch spezifische Antikörper gegen die Modifikationsstellen oder aber durch massenspektrometrische Analyse der Proteine untersucht werden.

Nach bisherigen Erkenntnissen sind p73 und Apaf-1 in die E2F1-induzierte p53-unabhängige Apoptose involviert (Irwin et al., 2000; Stiewe und Pützer, 2000; Moroni et al., 2001). Aber auch die direkte Aktivierung von Caspasen 3, 7, 8 und 9 durch E2F1 konnte gezeigt werden (Nahle et al., 2002). In allen Studien wurde deutlich, daß weitere bisher noch nicht identifizierte Signalwege und Faktoren in die E2F1-induzierte Apoptose involviert sein müssen, da nach einem '*knockdown*' der bisherigen Faktoren die Apoptoseinduktion nicht komplett unterbrochen wurde, sondern über alternative Signaltransduktionswege weiterlief. Dip wurde durch E2F1 transaktiviert und Dip-Überexpression führte in Zellen zum Absterben durch Apoptose. Ob Dip an der Weiterleitung E2F1-induzierter pro-apoptotischer Signale als zusätzlicher Faktor beteiligt ist, wurde durch '*knockdown*' von Dip untersucht. Brummelkamp et al. (2002) entwickelten eine leistungsfähige Technologie zur spezifischen Unterdrückung der Protein-Expression. Mit dieser Technologie werden mRNAs eines bestimmten Proteins mit '*small interfering*' RNAs (siRNAs) gezielt durch Hybridisierung gebunden und anschließend für die Degradation zugänglich gemacht. Durch Verwendung von siRNAs gegen Dip wurde die Transaktivierung von Dip spezifisch unterdrückt. In siGFP-infizierten Kontrollzellen dagegen wurde die 'normale' Transaktivierung von Dip nach Aktivierung von E2F1 nachgewiesen. Die Suppression von Dip führte zu einer verminderten E2F1-vermittelten Apoptoseinduktion. Damit einhergehend wurde in Langzeit Colony Assays und in FACS-Analysen eine signifikante Abnahme der Apoptoseinduktion im Vergleich zu siGFP-infizierten Zellen gezeigt. Damit konnte bestätigt werden, daß Dip an der p53-unabhängigen E2F1-induzierten Apoptose beteiligt ist. Die Dip-Unterdrückung führte erwartungsgemäß nicht zu vollständiger Blockade der Apoptose, da noch andere alternative Signalwege (wie z.B. p73) existieren, die E2F1-medierten Zelltod vermitteln. Die beobachtete Apoptoseinduktion, die sich in siGFP-infizierten Kontrollzellen 48 Stunden nach E2F1-Aktivierung dadurch auszeichnet, daß 50% der Zellen in sub-G1 Phase sind, konnte auch in anderen Zelltypen bestätigt werden. Stiewe und Pützer (2000) haben 72 Stunden nach E2F1-Aktivierung in Saos-2 ER-E2F1-Zellen eine 48%ige sub-G1 Population beschrieben. Dieser Effekt entspricht weitestgehend den hier beobachteten sub-G1 Populationen und unterstützt die beobachtete Intensität der Apoptoseinduktion in den H1299 Kontrollzellen. Bei einem adenoviralen Gentransfer wird etwa fünf Tage nach Infektion eine Abnahme der Transgenexpression beobachtet. Dieser Effekt wird vermutlich durch Abschalten des CMV-Promotors hervorgerufen. Deshalb wurde beim Colony Assay Langzeitexperiment die H1299 ER-E2F1-Zelllinie verwendet, weil hier keine Abnahme der Transgen-Expression beobachtet wird.

Die E2F1-Regulation von Dip wurde durch Dip-Promotorkonstruktanalysen genauer untersucht. Der Dip-Promotor wurde durch E2F1 nicht aktiviert, obwohl mehrere E2F-Bindungsstellen, die dem Konsensus-Sequenzmotiv entsprechen, identifiziert wurden. Dieser Effekt wurde in H1299 und in Saos-2 Zellen gezeigt. Der Promotor besitzt wie viele andere E2F-regulierte Promotoren keine TATA-Box, weist aber typische Bindungsstellen für den Sp1 Transkriptionsfaktor auf. Die Promotor-Aktivierung durch E2F1 über Sp1-Bindungsstellen ist in der Literatur beschrieben (Blais et al., 2002). Sp1 Promotor-Bindungsstellen können auch durch p53 gebunden werden. Promotoren anderer E2F1-regulierter Gene wie Apaf-1 oder p73 besitzen p53-Bindungsstellen. Der Dip-Promotor besitzt allerdings keine direkten p53-Bindungsstellen. Die Tatsache, daß der Promotor sich nicht durch E2F1-Expression aktivieren ließ, war sehr überraschend. In RT-PCR Untersuchungen wurde reproduzierbar eine direkte Aktivierung von Dip durch E2F1 gezeigt. Die Promotor-Reportergenanalysen wurden ebenfalls mit E2F1/DP1 Co-Transfektionen, mit E2F1-Überschuß und mit p73-Promotoren als Positivkontrolle durchgeführt. Daher ist davon auszugehen, daß Dip, anders als in den RT-PCR Analysen gezeigt, nicht direkt von E2F1 transaktiviert wird. Die vermeintlich direkte Aktivierung durch E2F1 in CHX-Anwesenheit ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die tatsächlich für die Transaktivierung benötigten zellulären Faktoren in ausreichender Menge in den Saos-2 ER-E2F1-Zellen bereits vorhanden waren, um einen transaktivierenden Effekt auszulösen. Da Saos-2 ER-E2F1-Zellen neben p53 auch kein funktionelles pRb exprimieren ist es sogar sehr wahrscheinlich, daß durch vermehrt freies E2F1 der oder die benötigten Mediatoren in erhöhter Konzentration vorlagen. Die Aktivierung von Dip als Resultat erhöhter E2F1-Aktivität steht außer Frage. In verschiedenen Zellsystemen konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die Induktion von Dip durch Aktivierung von E2F1 gezeigt werden.

Andere p53-unabhängige E2F1-regulierte pro-apoptotische Proteine stehen mit anderen Tumorsuppressoren in Interaktion. Apaf-1 kann von p53 transaktiviert werden (Fortin et al., 2001) und ist daher fähig, p53-abhängig und -unabhängig Apoptose zu vermitteln. Neben der Transaktivierung durch E2F1 wird p73 ebenfalls durch p53 induziert (Chen et al., 2001) und steht daher mit einem parallelen Weg in Verbindung. Dip wurde nur von p73 β induziert, während p73 α keinen Effekt auf die Expression hatte und p53 sogar reprimierend wirkte. Dieses Resultat ist erstaunlich, weil beide p73 Isoformen etwa gleich stark Apoptose induzieren (Jost et al., 1997). Dennoch könnte die Tatsache, daß nur p73 β in der Lage ist Dip zu induzieren, ebenfalls einen alternativen pro-apoptotischen Signalweg von Dip aufzeigen. Damit ergibt sich ein in Abbildung 4.1 dargestelltes Modell für die Dip-Regulation und die Dip-induzierte Apoptose.

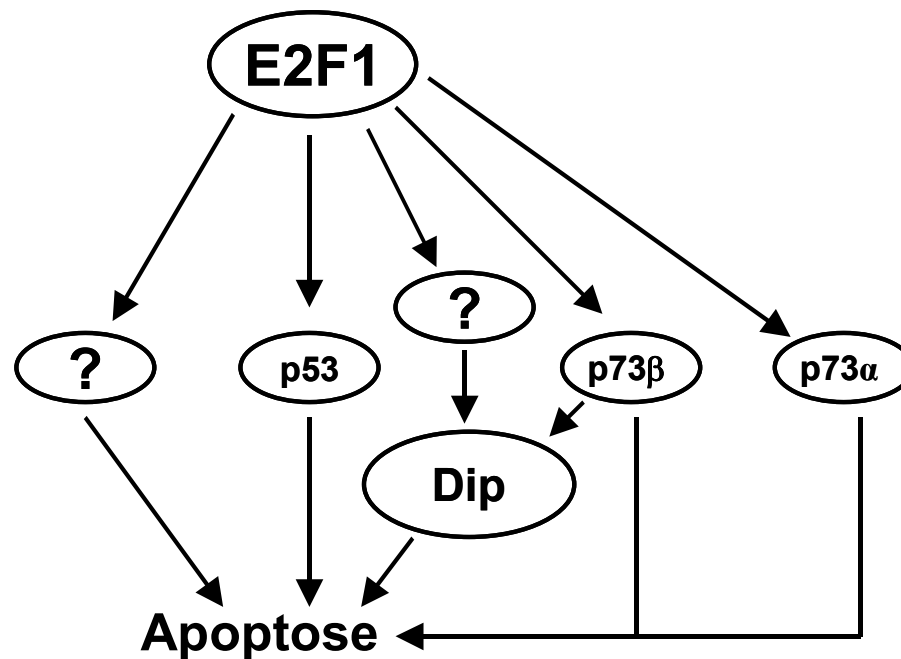


Abb. 4.1. Modell Dip-induzierter p53-unabhängiger Apoptose. Dip wird durch E2F1 induziert. Mindestens ein weiteres Protein ist an dieser Aktivierung beteiligt. Dip wird durch p73β induziert. Dip aktiviert die Apoptoseinduktion. Es existieren alternative p53-unabhängige Signalwege.

Datenbankrecherchen haben die Lokalisation von Dip in den Mitochondrien suggeriert. Diese Lokalisation konnte nicht nur durch Immunfluoreszenzanalysen, sondern auch durch Analyse subzellulärer Fraktionen bestätigt werden. Allerdings wurde wegen ungeeigneter Antikörper nur überexprimiertes His-markiertes Dip in Immunfluoreszenzanalysen detektiert. Jedoch wurde endogenes Dip-Protein bei der subzellulären Fraktionierung nur in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen. Nach E2F1-Induktion nimmt die Dip-Proteinbande in den Mitochondrien signifikant ab, ist aber im Cytoplasma nicht zu finden. Die Abnahme der Proteinmenge könnte durch Ausschleusung des Proteins aus den Mitochondrien hervorgerufen worden sein. Wegen der nukleären Lokalisationsdomäne von Dip ist diese Postulation sehr wahrscheinlich. Es kann spekuliert werden, daß Dip direkt aus den Mitochondrien in den Zellkern transloziert und auf seinem Weg nur sehr kurzfristig im Cytoplasma zu finden ist. Diese Translokation des Proteins ließ sich ebenfalls wegen ungeeigneter Antikörper nicht verfolgen. Durch Aufreinigung von Zellkernextrakten nach E2F1-Aktivierung und Immunfluoreszenzanalysen mit einem geeigneten Antikörper ließe sich diese Hypothese weiter untersuchen. Für diese Translokationstheorie spricht außerdem, daß weitere apoptotische Mechanismen wie die Fragmentierung genomischer DNA im Zellkern ausgelöst werden müssen. Ob diese Mechanismen jedoch von Dip selbst oder durch andere Mediatoren ausgelöst werden bleibt zu klären. Die Vermutung, daß eine Degradation von Dip nach E2F1-Induktion die Ursache für die Abnahme der Proteinmenge in den Mitochondrien ist, würde gegen alle bisherigen Daten argumentieren.

Bisher wurde ein anderes mitochondriales Protein der '*apoptosis inducing factor*' (AIF) gefunden, der in den Mitochondrien lokalisiert ist und bei Apoptoseinduktion in den Zellkern transloziert (Susin et al., 1999). Dieses Flavoprotein löst im Zellkern eine Caspase-unabhängige Kondensation von Chromatin und die Fragmentierung von DNA aus (Lorenzo et al., 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß AIF auch an E2F1-induzierter Apoptose in Colonkarzinomzellen beteiligt ist (Vorbürger et al., 2003). Ob nun Dip ähnlich wie AIF auch Caspase-unabhängig Apoptose auslösen kann muß erst geklärt werden. Untersuchungen der Caspase-Kaskade mit spezifischen Inhibitoren haben gezeigt, daß Apoptose über Caspase-abhängige Mechanismen aber auch Caspase-unabhängig verlaufen kann (Rathmell und Thompson, 1999). Auf dem Caspase-abhängigen Signalweg wird die Effektor-Caspase-3 durch Prozessierung verschiedener Pro-Caspasen aktiviert. Hierzu zählen die Aktivierung von Pro-Caspase-9 über die Mitochondrien (Reed und Paternostro, 1999), die Aktivierung von Pro-Caspase-8 über den rezeptorvermittelten Signalweg (Martin et al., 1998; Srinivasan et al., 1998) und die Aktivierung von Pro-Caspase-12 durch Streßsignale des endoplasmatischen Retikulums (Nakagawa et al., 2000). Die aktivierte Caspase-3 deaktiviert mehrere Substrate wie PARP oder '*inhibitors of caspase-activated DNases*' (ICAD) durch Spaltung. Die Konsequenz dieser Spaltungen sind der Verlust zellulärer Reparaturmechanismen (PARP) (Kaufmann et al., 1993) und die Aktivierung von Caspase-abhängigen DNasen (CAD), die zur Fragmentierung von chromosomaler DNA führen (Enari et al., 1998). Die Caspase-unabhängige Apoptose läuft vor allem über sog. nicht-Caspase Proteasen ab (Johnson 2000; Stenson-Cox et al., 2003), die ebenfalls klassische Caspase-Substrate spalten können (Leist und Jäätelä; 2001). Eines dieser Caspase-unabhängigen Serin-Proteasen ist das apoptotische Protein AP24, das DNA-Degradation induzieren kann (Wright et al., 1996; Torriglia et al., 1998). Die Konvergenz der Caspase-abhängigen und -unabhängigen Mechanismen wurde dadurch gezeigt, daß PARP nach streßbedingter Spaltung auf dem Caspase-unabhängigen Signalweg auch AIF-Freisetzung aus den Mitochondrien und Apoptose induzieren kann (Yu et al., 2002). Daher bleibt zu klären, ob Dip die PARP-Spaltung über Caspase-3 induziert oder aber Caspase-unabhängige Mechanismen für diesen Prozeß verantwortlich sind. Da ein weiterer mitochondrialer Faktor (AIF) ebenfalls Caspase-unabhängig Apoptose auslöst ist, dies ein möglicher Mechanismus für Dip. Weiterhin kann spekuliert werden, daß Dip wegen seiner Involvierung in den Mitochondrien auch die mitochondrial assoziierte Caspase-9 aktivieren kann.

Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol ist ein häufig beschriebenes Ereignis bei der Induktion von Apoptose (Hengartner, 2000). Bei E2F1-induzierter Apoptose wurde die Freisetzung von Cytochrom c bisher jedoch nur in p53-positiven Zellen beobachtet (Moroni et al., 2001; Furukawa et al., 2002). Außerdem ist der zugrundeliegende Mechanismus dieser Freisetzung durch E2F1-Aktivität bislang nicht aufgeklärt. Daher ist es erwähnenswert, daß hier zum ersten Mal die Freisetzung von Cytochrom c in p53-negativen Zellen gezeigt werden konnte. Der Anstieg von Cytochrom c ist auf eine tatsächliche Freisetzung und nicht etwa auf eine Verunreinigung der cytosolischen Fraktion durch mitochondriale Proteine zurückzuführen, denn das mitochondriale Markerprotein Cox 4 ist in diesen Fraktionen abwesend. Durch diese neuen Erkenntnisse ergibt sich ein neues Bild E2F1-induzierter Apoptose.

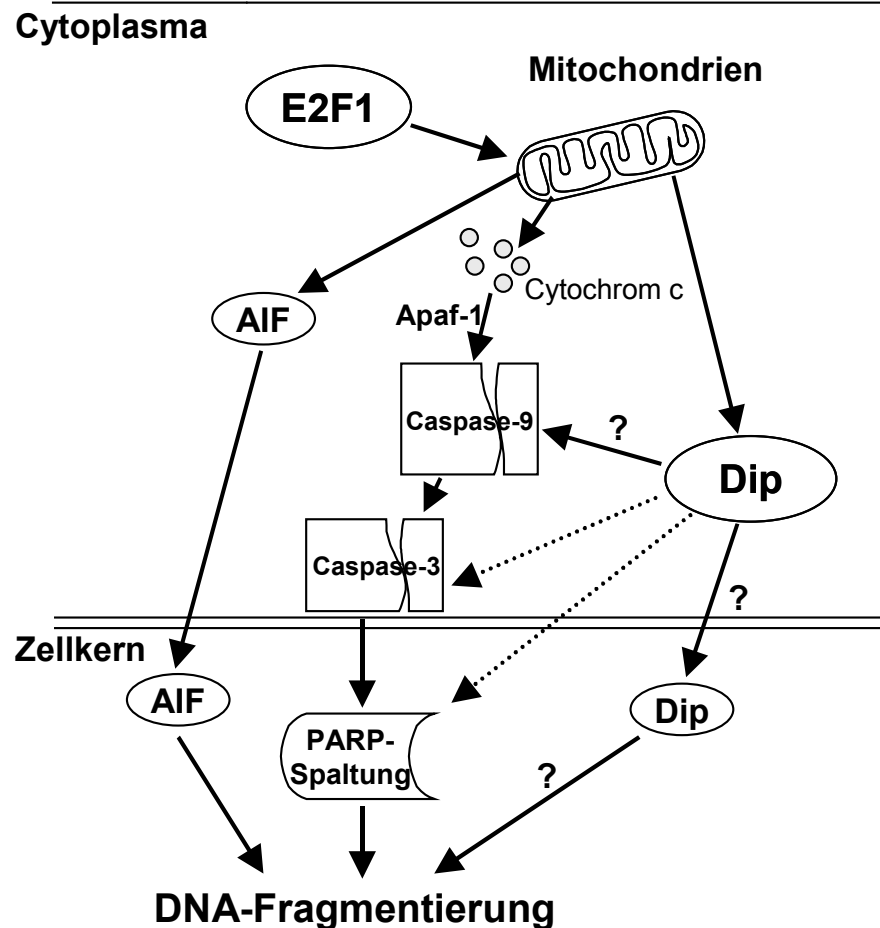


Abb. 4.2 Modell E2F1-induzierter mitochondrialer Apoptose. E2F1 induziert Cytochrom c, AIF- und Dip-Freisetzung aus den Mitochondrien. Cytochrom c aktiviert mit Apaf-1 über die Apoptosombildung Caspase-9. AIF transloziert in den Kern und induziert DNA-Fragmentierung. Dip induziert PARP-Spaltung. Dip aktiviert die PARP-Spaltung durch Caspase-3 Aktivierung oder unabhängig von dieser Protease. Dip aktiviert möglicherweise Caspase-9 und transloziert vermutlich in den Zellkern.

4.4 Ausblick

Obwohl aus den Daten bereits wichtige Erkenntnisse für die molekularen Zusammenhänge E2F1-induzierter und Dip-involvierter Apoptose resultieren, bleiben einige Fragen offen:

1. Welche Modifikationen führen zu den beiden endogenen Proteinformen, die nach E2F1-Induktion beobachtet werden können? Weiterhin ist nicht klar, warum vier Banden nach adenoviraler Transduktion detektiert werden und wie die zusätzlichen Proteinisoformen aufgebaut sind.
2. Welche Mediatoren sind in die E2F1-induzierte Dip-Aktivierung involviert? Wie läuft die E2F1-induzierte Apoptose unter Dip-Involvierung ab?
3. Transloziert Dip tatsächlich in den Zellkern und sind andere Proteine an diesem Prozeß beteiligt? Löst Dip Caspase-unabhängig Apoptose aus oder werden Caspase-3 bzw. Caspase-9 durch Dip aktiviert?

Neben der genaueren Analyse des Dip-assoziierten Apoptosemechanismus wird zukünftig die Anwendung von Dip für gentherapeutische Ansätze interessant sein. Dabei stellt sich die Frage, ob Dip-Überexpression auch in *ex vivo* und *in vivo* Tumorwachstumsstudien durch pro-apoptotische Mechanismen zu Tumorregressionen führen kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Tumorzellen zeichnen sich im Vergleich zu normalen Zellen durch einen Verlust der physiologischen Zellproliferationskontrolle aus. Diese Störung beruht im wesentlichen auf Aberrationen im pRb-Cdi-Signalweg, die zu einer deregulierten Aktivität der E2F Transkriptionsfaktoren führen. Da E2Fs entscheidend an der Regulation des G1/S-Phasenübergangs beteiligt sind, führt diese erhöhte E2F-Aktivität zu einer Steigerung der Zellproliferationsrate. Neben diesem onkogenen Potential besitzt E2F1 jedoch zusätzlich pro-apoptotische Eigenschaften, die für die Tumorsuppressoraktivität von E2F1 verantwortlich gemacht werden. Um das pro-apoptotische Potential von E2F1 besser zu verstehen, ist die Kenntnis der durch E2F1-regulierten Gene, deren Funktion und Regulation essentiell.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausgehend von regulierbaren E2F1-exprimierenden Zelllinien eine DNA-Mikroarray-Analyse durchgeführt, die zur Identifizierung einer Vielzahl neuer E2F1-regulierter Gene führte. Validierungen der Mikroarray-Daten hoben die drei Gene KIAA0455, KIAA0717 und KIAA0767 unbekannter Funktion als mögliche neue pro-apoptotische E2F1-Zielgene hervor. Überexpressionsstudien dieser drei Proteine ordneten dem KIAA0767 Genprodukt, das als Dip für '*death inducing protein*' bezeichnet wurde, eindeutig pro-apoptotische Funktionen zu. Funktionelle Analysen identifizierten Dip als einen weiteren an der Apoptose beteiligten Faktor. Weiterhin wurde die mitochondriale Lokalisation von Dip sowie der Export aus diesem subzellulären Kompartiment während E2F1-induzierter Apoptose nachgewiesen. Dip ist wie klassische Tumorsuppressorproteine während des normalen Zellzyklus nicht detektierbar. Schließlich wurde die Aktivierung von Dip durch p73 β nachgewiesen.

Durch die Identifizierung dieses neuen E2F1-Targetgens wurde die Grundlage geschaffen, um nach weiteren Charakterisierungen langfristig ein neues Transgen für eine effizientere Tumorthherapie auf gentherapeutischer Basis zu besitzen. Gerade vor dem Hintergrund, daß viele Tumoren eine erhöhte Resistenz gegen p53-vermittelte Tumorsuppressorgentherapie zeigen, könnten neue, unabhängig von p53 agierende Faktoren diese Resistenz durchbrechen.

6 LITERATUR

- Adams, M.R., Sears, R., Nuckolls, F., Leone, G., und Nevins, J.R. (2000).** Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 3633-39.
- Allen, K.E., de la Luna, S., Kerkhoven, R.M., Bernards, R., und La Thangue, N.B. (1997).** Distinct mechanisms of nuclear accumulation regulate the functional consequence of E2F transcription factors. *J. Cell. Biol.* **110**: 2810-31.
- Asano, M., Nevins, J.R., und Wharton, R. (1996).** Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev.* **10**: 1422-32.
- Ashkenazi, A. und Dixit, V.M. (1998).** Death receptors: Signaling and modulation. *Science* **281**: 1305-08.
- Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., und Vousden, K.H. (1998).** p14^{ARF} links the tumour suppressor RB and p53. *Nature* **395**: 124-125.
- Bagchi, S., Weinmann, R., und Raychaudhuri, P. (1991).** The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* **65**: 1063-72.
- Balint, E. und Vousden, K.H. (1999).** Mdm2 binds p73 α without targeting degradation. *Oncogene* **18**: 3923-29.
- Bandara, L.R. und La Thangue, N.B. (1991).** Adenovirus E1A prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* **351**: 494-97.
- Blais, A., Monte, D., Pouliot, F., und Labrie, C. (2002).** Regulation of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p18^{INK4c} by the transcription factors E2F1 and Sp1. *J. Biol. Chem.* **277**: 31679-93.
- Blattner, C., Sparks, A., und Lane, D. (1999).** Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 3704-13.
- Botz, J., Zeffass-Thome, K., Spitkovsky, D., Delius, H., Vogt, B., Eilers, M., Hatzigeorgiou, A., und Jansen-Dürr, P. (1996).** Cell cycle regulation of the murine CyclinE gene depends on an E2F binding site in the promoter. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3401-09.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., und Kouzarides, T. (1998).** Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* **391**: 597-601.
- Brummelkamp, T., Bernards, R., und Agami, R. (2002).** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**: 550-53.

- Chan, H.M. und La Thangue, N.B. (2001).** P300/CBP proteins: HAT for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell. Sci.* **114**: 2363-73.
- Chandrasekaran, C., Coopersmith, C.M., und Gordon, J.I. (1996).** Use of normal and transgenic mice to examine the relationship between terminal differentiation of intestinal epithelial cells and accumulation of their cell cycle regulators *J. Biol. Chem.* **271**: 28414-21.
- Chen, X., Zheng, Y., Zhu, J., Jiang, J., und Wang, J. (2001).** p73 is transcriptionally regulated by DNA damage, p53, and p73. *Oncogene* **20**: 769-74.
- Chen, C., Kang, Y., Siegel, P.M., und Massague, J. (2002).** E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF β receptor to c-myc repression. *Cell* **110**: 19-32.
- Chittenden, T., Livingston, D.M., und Kaelin, W.G. Jr. (1991).** The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Cell* **65**: 1073-82.
- Clarke, A.R., Maandag, E.R., Van Roon, M., Van der Luft, N.M.T., Van der Valk, M., Hooper, M.L., Berns, A., und Te Riele, H (1992).** Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* **359**: 328-30.
- Cobrinik, D., Lee, M.H., Hannon, G., Mulligan, G., Bronson, R.T., Dyson, N., Harlow, E., Beach, D., Weinberg, R.A., und Jacks, T (1996).** Shared role of the pRb-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes Dev.* **10**: 1633-44.
- Dalton, S. (1992).** Cell cycle regulation of the human CDC2 gene. *EMBO J.* **11**: 1797-1804.
- D'aquila, R.T., Bechtel, L.J., Videler, J.A., Eron, J.J., Gorczyca, P., und Kaplan, J.C. (1991).** Maximizing sensitivity and specificity by preamplification heating. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3749.
- DeBruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., und Leone, G. (2003).** Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* **278**: 42041-49.
- DeGregori, J., Leone, G., Ohtani, K., Miron, A., und Nevins, J.R. (1995).** E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev.* **9**: 2873-87.
- DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L., und Nevins, J.R. (1997).** Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 7245-7250.
- De la Luna, S., Burden, M.J., Lee, C.-W., und La Thangue, N.B. (1996).** Nuclear accumulation of the E2F heterodimer regulated by subunit composition and alternative splicing of a nuclear localization signal. *J. Cell. Sci.* **109**: 2443-52.
- Dicker, A.J., Popa, C., Dahler, A.L., Serewko, M.M., Hilditch-Maguire, P.A., Frazer, I.H., und Saunders, N.A. (2000).** E2F-1 induces proliferation specific genes and

- suppresses squamous differentiation-specific genes in human epidermal keratinocytes. *Oncogene* **19**: 2887-94.
- Dobbelstein, M., Wienzek, S., König, C., und Roth, S. (1999).** Inactivation of the p53-homologue p73 by the mdm2-oncoprotein. *Oncogene* **18**: 2101-06.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., und Wang, X. (2000).** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**: 33-42.
- Dyson, N. (1998).** The regulation of E2F by pRb-family proteins. *Genes Dev.* **12**: 2245-62.
- Elledge, S.J. und Harper, J.W. (1998).** The role of protein stability in the cell cycle and cancer. *Biochem. Biophys. Acta* **1377**: M61-70.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., und Nagata, S. (1998).** A Caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**: 43-50.
- Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, W.G. Jr, Livingston, D.M., Orkin, S.H., und Greenberg, M.E. (1996).** E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* **85**: 549-61.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M., und Drijia, T.P. (1986).** A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**: 643-46.
- Fortin, A., Cregan, S.P., MacLaurin, J.G., Kushwaha, N., Hickmann, E.S., Thompson, C.S., Hakim, A., Albert, P.R., Cecconi, F., Helin, K., Park, D.S., und Slack, R.S. (2001).** APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J. Cell Biol.* **155**: 207-16.
- Furukawa, Y., Nishimura, N., Furukawa, Y., Satoh, M., Endo, H., Iwase, S., Yamada, H., Matsuda, M., Kano, Y., und Nakamura, M. (2002).** Apaf-1 is a mediator of E2F1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**: 39760-68.
- Gaubatz, S., Lees, J.A., Lindeman, G.J., und Livingston, D.M. (2001).** E2F-4 is exported from the nucleus in a CRM-1-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 1384-92.
- Gao, G., Bracken, A.P., Burkard, K., Pasini, D., Classon, M., Attwooll, C., Sagara, M., Imai, T., Helin, K., und Zhao, J (2003).** NPAT expression is regulated by E2F and is essential for cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 2821-33.
- Graham, F.L. Smiley, J., Russel, W.C., und Nairn, R. (1977).** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**: 59-72.
- Green, D.R. und Reed, J.C. (1998).** Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-12.

- Guy, C.T., Zhou, W., Kaufman, S., und Robinson, M.O. (1996).** E2F-1 blocks terminal differentiation and causes proliferation in transgenic megakaryocytes. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 685-93.
- Hallstrom, T.C. und Nevins, J.R. (2003).** Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 10848-53.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000)** The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Harbour, J.W. und Dean, D.C. (2000).** The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* **14**: 2393-2409.
- Hartwell, L.H. und Kastan, M. B. (1994).** Cell cycle control and cancer. *Science* **266**: 1821-28.
- He, T.C., Zhou, S., DaCosta, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., und Vogelstein, B. (1998).** A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2509-14.
- Helin, K., Lees, J.A., Vidal, M., Dyson, N., Harlow, E., und Fattaey, A. (1992).** A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell* **70**: 337-50.
- Hengartner, M. O. (2000).** The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-76.
- Hiebert, S.W., Packham, G., Strom, D.K., Haffner, R., Oren, M., Zambetti, G., und Cleveland, J.L. (1995).** E2F-1:DP-1 induces p53 and overrides survival factors to trigger apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6864-74.
- Holmberg, C., Helin, K., Schested, M., und Karlström, O. (1998).** E2F-1 induced p53 independent apoptosis in transgenic mice. *Oncogene* **17**: 143-55.
- Hsieh, J.-K., Fredersdorf, S., Kouzarides, T., Klaus, M., und Lu, X. (1997).** E2F-1 induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. *Genes Dev.* **11**: 1840-52.
- Hsieh, J.-K., Yap, D. O'Connor, D.J., Fogal, V., Fallis, L., Chan, F., Zhong, S., und Lu, X. (2002).** Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 78-93.
- Hsu, H., Xiong, J., und Goeddel, D.V. (1995).** TRADD signals cell death and NF κ B activation. *Cell* **81**: 495-504.
- Hu, Y., Benedict, M.A., Ding, L., und Nunez, G. (1999).** Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* **18**: 3586-95.
- Humbert, P.O., Verona, R., Trimarchi, J.M., Rogers, C., Dandapani, S., und Lees, J.A. (2000a).** E2F3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes Dev.* **14**: 690-703.

- Humbert, P.O., Rogers, C., Ganiatsas, S., Landsberg, R.L., Trimarchi, J.M., Dandapani, S., Brugnara, C., Erdman, S., Schrenzel, M., Bronson, R.T., und Lees, J.A. (2000b). E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Mol. Cell.* **6**: 281-91.
- Irwin, M., Martin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., und Kaelin, W.G. Jr. (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* **407**: 645-48.
- Ishida, S., Yamashita, T., Nakaya, U., und Tokino, T. (2000). Adenovirus-mediated transfer of p53-related genes induces apoptosis of human cancer cells. *Jpn J Cancer Res* **91**: 174-80.
- Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., und Nevins, J.R. (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 4684-99.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A., und Weinberg, R.A. (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* **359**: 295-300.
- Johnson, D.E. (2000). Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia* **14**: 1695-1703.
- Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D., und Nevins, J.R. (1993). Expression of transcription factor E2F-1 induces quiescent cells to enter S Phase. *Nature* **365**: 349-52.
- Johnson, D.G., Cress, W.D., Jakoi, L., und Nevins, J.R. (1994). Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12823-27.
- Jost, C.A., Marin, M.C., und Kaelin, W.G. Jr (1997). p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* **389**: 191-94.
- Kaelin, W.G. Jr., Krek, W., Sellers, W.R., DeCaprio, J.A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C.S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P.J., Blanar, M.A., et al. (1992). Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* **70**: 351-64.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., und Poirier, G.G. (1993). Specific proteolytic cleavage of Poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**: 3976-85.
- Kel, A.E., Kel-Margoulis, O.V., Farnham, P.J., Bartley, S.M., Wingender, E., und Zhang, M.Q. (2001). Computer-assisted identification of cell cycle-regulated genes: new targets for E2F transcription factors. *J. Mol. Biol.* **309**: 99-120.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., und Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-rangeing implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**: 239-57.

- Kowalik, T.F., DeGregori, J., Schwarz, J.K., und Nevins, J.R. (1995).** E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. *J. Virol.* **69**: 2491-2500.
- Kowalik, T.F., DeGregori, J., Leone, G., Jakoi, L., und Nevins, J.R. (1998).** E2F1-specific induction of apoptosis and p53 accumulation, which is blocked by Mdm2. *Cell Growth Differ.* **9**: 113-18.
- Krek, W., Xu, G., und Livingston, D.M. (1995).** Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell* **83**: 1149-58.
- Laemmli U. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-85.
- Lam, E. W. und Watson, R.J. (1993).** An E2F-binding site mediates cell-cycle regulated repression of mouse B-myb transcription. *EMBO J.* **12**: 2705-13.
- Lee, E.Y.H.P., Chang, C.-Y., Hu, N., Wang, Y.-C.J., Lai, C.-C., Herrup, K., Lee, W.-H., und Bradley, A. (1992).** Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* **359**: 288-94.
- Lee, M.H., Williams, B.O., Mulligan, G., Mukai, S., Bronson, R.T., Dyson, N., Harlow, E., und Jacks, T. (1996).** Targeted disruption of p107, functional overlap between p107 and Rb genes. *Genes Dev.* **10**: 1621-32.
- Leist, M. und Jäätelä, M. (2001).** Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol Cell Biol* **2**: 589-98.
- Leone, G., Degregori, J., Yan, Z., Jakoi, L., Ishida, S., Williams, R.S., und Nevins, J.R. (1998).** E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev.* **12**: 2120-30.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., und Wang, X. (1997).** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-89.
- Lin, W.C., Lin, F.T., und Nevins, J.R. (2001).** Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev.* **15**: 1833-44.
- Lindeman, G.J., Dagnino, I., Gaubatz, S., Xu, Y., Bronson, R.T., Warren, H.B., und Livingston, D.M. (1998).** A specific nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Genes Dev.* **12**: 1092-98.
- Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G., und Evan, G.I. (1995).** A modified oestrogen receptor ligand binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1686-90.

- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V., und Karin, M. (1996).** Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* **87**: 565-76.
- Loughran, O. und La Thangue, N.B. (2000).** Apoptotic and growth-promoting activity of E2F modulated by MDM2. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 2186-97.
- Lorenzo, H.K., Susin, S. A., Penninger, J.M., und Kroemer, G. (1999).** Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.* **6**: 516-24.
- Lowe, S.W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H.E., Fisher, D. E., Housman, D. E., und Jacks, T. (1994).** p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* **266**: 807-10.
- Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J., und Helin, K. (1996).** Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4a mediated growth suppression. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1047-57.
- Lukas, C., Sorensen, C.S., Kramer, E., Santoni-Rugiu, E., Lindeneg, C., Peters, J., Bartek, J., und Lukas, J. (1999).** Accumulation of Cyclin B1 requires E2F and Cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* **401**: 815-18.
- Lundberg, A.S. und Weinberg, R.A. (1998).** Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 753-61.
- Ma, Y., Croxton, R., Moorer, R.L. Jr., und Cress, W.D. (2002).** Identification of novel E2F1-regulated genes by microarray. *Arch. Biochem. Biophys.* **399**: 212-24.
- Magae, J., We, C., Illenye, S., Harlow, E., und Heintz, N.H. (1996).** Nuclear localisation of DP and E2F transcription factors by heterodimeric partners and retinoblastoma protein family members. *J. Cell. Sci.* **109**: 1717-26.
- Martelli, F., Hamilton, T., Silver, D.P., Sharpless, N.E., Bardeesy, N., Rokas, M., DePino, R.A., Livingston, D.M., und Grossman, S.R. (2001).** p19^{ARF} targets certain E2F species for degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4455-60.
- Martin, D.A., Siegel, R.M., Zheng, L., und Lenardo, M.J. (1998).** Membrane oligomerization and cleavage activates caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J. Biol. Chem.* **273**: 4345-49.
- Martinez-Balbas, M.A., Bauer, U.-M., Nielsen, S.J., Brehm, A., und Kouzarides, T. (2000).** Regulation of E2F-1 activity by acetylation *EMBO J.* **19**: 662-71.
- Mason, S., Loughran, O., und La Thangue, N.B. (2002).** P14^{ARF} regulates E2F activity. *Oncogene* **21**: 4220-30.
- Mittnacht, S. (1998).** Control of pRb phosphorylation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 21-27.

- Morkel, M., Wenkel, J., Bannister, A.J., Kouzarides, T., und Hagemeier, C. (1997).** An E2F-like repressor of transcription. *Nature* **390**: 567-68.
- Moroni, M.C., Hickmann, E.S., Denchi, E.L., Capara, G., Colli, E., Cecconi, F., Müller, H., und Helin, K. (2001).** Apaf-1 is a transcriptional target for E2F1 and p53. *Nat. Cell Biol.* **3**: 552-58.
- Morris, L., Allen, K.E., und La Thangue, N.B. (2000).** Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators. *Nat. Cell Biol.* **2**: 232-39.
- Mulligan, G. und Jacks, T. (1998).** The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet.* **14**: 223-29.
- Mullis, K., Falcoona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Quant. Biol.* **51**: 263-73.
- Müller, H. und Helin, K. (2000).** The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochem. Biophys. Acta* **1470**: M1-12.
- Müller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D., und Helin, K. (2001).** E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev.* **15**: 267-285.
- Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R.V., McCurrach, M.E., Jacobson, M.D., Narita, M., Zhang, M.Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D., und Lowe, S. (2002).** Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat. Cell Biol.* **4**: 859-64.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., und Yuan, J. (2000).** Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**: 98-103.
- Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.-M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E., und Kouzarides, T. (2001).** Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**: 561-65.
- Nevins, J.R. (1992).** E2F: A link between the Rb tumour suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**: 424-29.
- Nevins, J.R. (1998).** Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ.* **9**: 585-93.
- Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M., und Nakatani, Y. (2002).** A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296**: 1132-36.

- Ohtani, K., Degregori, J., und Nevins, J.R. (1995).** Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12146-50.
- Ormerod, M.G., Sun, X.M., Brown, D., Snowden, R.T., und Cohen, G.M. (1993).** Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta Oncol* **32**: 417-24.
- Ormerod, M.G. (1998).** The study of apoptotic cells by flow cytometry. *Leukemia* **12**: 1013-25.
- Pan, G., O'Rourke, K., und Dixit, V.M. (1998a).** Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J. Biol. Chem.* **273**: 5841-45.
- Pan, H., Yin, C., Dyson, N.J., Harlow, E., Yamasaki, L., und Van Dyke, T. (1998b).** Key roles for E2F1 in signaling p53-dependent apoptosis and in cell division within developing tumors. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 283-92.
- Phillips, A.C., Bates, S., Ryan, K.M., Helin, K., und Vousden, K.H. (1997).** Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1. *Genes Dev.* **11**: 1853-63.
- Phillips, A.C., Ernst, M.K., Bates, S., Rice, N.R., und Vousden, K.H. (1999).** E2F1 potentiates cell death by blocking anti-apoptotic signalling pathways. *Mol. Cell* **4**: 771-81.
- Phillips, A.C. und Vousden, K.H. (2001).** E2F-1 induced apoptosis. *Apoptosis* **6**: 173-82.
- Pierce, A.M., Gimenez-Conti, I.B., Schneider-Broussard, R., Martinez, L.A., Conti, C.J., und Johnson, D.G. (1998a).** Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8858-63.
- Pierce, A.M., Fisher, S.M., Conti, C.J., und Johnson, D.G. (1998b).** Deregulated expression of E2F1 induces hyperplasia and cooperates with ras in skin tumor development. *Oncogene* **16**: 1267-76.
- Pierce, A.M., Schneider-Broussard, R., Gimenez-Conti, I.B., Russel, J.L., Conti, C.J., und Johnson, D.G. (1999).** E2F-1 has both oncogenic and tumour-suppressive properties in transgenic model. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 6408-14.
- Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E., und Ginsberg, D. (2002).** E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene* **21**: 437-446.
- Poot, M., Zhang, Z.Y., Kramer, J.A., Wells, K.S., Jones, L.J., Hanzel, D.K., Lugade, A.G., Singer, V.L., und Haugland, R.P. (1996).** Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem.* **44**: 1363-72.
- Porse, B.T., Pedersen, T.A., Xiufeng, X., Lindberg, B., Wewer, B.M., Friis-Hansen, L., und Nerlov, C. (2001).** E2F repression by C/EBP is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo. *Cell* **107**: 247-58.

- Pützer B.M., Stiewe T., Crespo F., und Esche H. (2000).** Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy. *Gene Ther.* **7**: 1317-25.
- Pützer, B.M., Bramson, J., Addison, C.L., Hitt, M., Siegel, P., Muller, P.J., und Graham, F.L. (1998).** Combination therapy with IL-2 and wild-type p53 expressed by Ad-vectors potentiates tumor regression in a murine model of breast cancer. *Hum. Gene Ther.* **9**: 707-18.
- Qin, X.Q., Livingston, D.M., Kaelin, W.G. Jr, und Adams, P.D. (1994).** Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10918-22.
- Rathmell, J.C. und Thompson, C.B. (1999).** The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **17**: 781-828.
- Reed, J.C. und Paternostro, G. (1999).** Postmitochondrial regulation of apoptosis during heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 7614-16.
- Rempel, R.E., Saenz-Robles, M.T., Storms, R., Morham, S., Ishida, S., Engel, A., Jakoi, L., Melhem, M.F., Pipas, J.M., Smith, C., und Nevins, J.R. (2000).** Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Mol. Cell* **6**: 293-306.
- Robertson, K.D. und Jones, P.A. (1998).** The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 6457-73.
- Rogoff, H.A., Pickering, M.T., Debatis, M.E., Jones, S., und Kowalik, T.F. (2002).** E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 5308-18.
- Ross, J.F., Lui, X., und Dynlacht, B.D. (1999).** Mechanism of transcriptional repression of E2F by the retinoblastoma tumour suppressor. *Mol. Cell* **3**: 195-205.
- Russel, J.L., Powers, J.T., Rounbehler, R.J., Rogers, P.M., Conti, C.J., und Johnson, D.G. (2002).** ARF differentially modulates apoptosis induced by E2F1 and Myc. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 1360-68.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Saavedra, H.I., Wu, L., deBruin, A., Timmers, C., Rosol, T.J., Weinstein, M., Robinsion, M.L., und Leone, G. (2002).** Specificity of E2F1, E2F2, and E2F3 in mediating phenotypes induced by loss of Rb. *Cell Growth Differ.* **13**: 215-25.
- Schwarz, J.K., Bassing, C.H., Kovesdi, I., Datto, M.B., Blazing, M., George, S., Wang, X., und Nevins, J.R. (1995).** Expression of the E2F-1 transcription factor

- overcomes TGF- β mediated growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 483-87.
- Sherr, C.J. (1996).** Cancer cell cycles. *Science* **274**: 1672-77.
- Sherr, C.J. und Roberts, J.M. (1999).** CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**: 1501-12.
- Slansky, J. und Farnham, P.J. (1996).** Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **208**: 1-30.
- Srinivasan, A., Li, F., Wong, A., Kodandapani, L., Smidt, Jr. R., Krebs, J.F., Fritz, L.C., Wu, J.C., und Tomaselli, K.J. (1998).** Bcl-xL functions downstream of caspase-8 to inhibit Fas- and tumour necrosis factor receptor 1-induced apoptosis of MCF7 breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 4523-29.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., und Alnemri, E.S. (1998).** Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* **1**: 949-57.
- Stanelle, J., Stiewe, T., Theseling, C.C., Peter, M., und Pützer, B.M. (2002).** Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucleic Acids Res.* **30**: 1859-67.
- Stanelle, J., Stiewe, T., Röddicker, F., Köhler, K., Theseling, C.C., und Pützer, B.M. (2003).** Mechanism of E2F1-induced apoptosis in primary vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* **59**: 512-19.
- Stenson-Cox, C., FitzGerald, U., und Samali, A. (2003).** In the cut and thrust of apoptosis, serine proteases come of age. *Biochem. Pharmacol.* **66**: 1469-74.
- Stevens, C, Smith, L., und La Thangue, N.B. (2002).** Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **5**: 401-09.
- Stevens, C. und La Thangue, N.B. (2003).** E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Arch. Biochem. Biophys.* **412**: 157-69.
- Stiewe, T. und Pützer, B.M. (2000).** Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat. Genet.* **26**: 464-69.
- Stiewe, T. und Pützer, B.M. (2001).** p73 in apoptosis. *Apoptosis* **6**: 447-52.
- Stiewe, T., Theseling, C. C., und Pützer, B. M. (2002).** Transactivation-deficient Δ TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding. *J. Biol. Chem.* **277**: 14177-85.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., und Kroemer, G. (1999).** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441-46.

- Tanaka, H., Matsumura, I., Ezoe, S., Satoh, Y., Sakamaki, T., Albanese, C., Machii, T., Pestell, R.G., und Kanakura, Y. (2002).** E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF- κ B activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol. Cell* **9**: 1017-29.
- Takahashi, Y., Rayman, J.B., und Dynlacht, B.D. (2000).** Analysis of promoter binding by the E2F and pRb families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.* **14**: 804-16.
- Tao, Y. Kassatly, R.F., Cress, D.W., und Horowitz, J.M. (1997).** Subunit composition determines E2F DNA-binding site specificity. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6994-7007.
- Tolbert, D., Lu, X., Yin, C., Tantama, M., und Van Dyke, T. (2002).** p19(ARF) is dispensable for oncogenic stress-induced p53-mediated apoptosis and tumor suppression in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 370-77.
- Tommasi, S. und Pfeifer, G.P. (1995).** In vivo structure of the human cdc2 promoter: release of a p130-E2F4 complex from sequences immediately upstream of the transcription initiation site coincides with induction of cdc2 expression. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6901-13.
- Torriglia, A., Perani, P., Brossas, J.Y., Chaudun, E., Treton, J., Courtois, Y., und Counis, M.F. (1998).** L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 3612-19.
- Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Wen, J., und Lees, J.A. (2001).** The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 1519-24.
- Trimarchi, J.M. und Lees, J.A. (2002).** Sibling rivalry in the E2F family *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **3**: 11-20.
- Trouche, D., Cook, A., und Kouzarides, T. (1996).** The CBP co-activator stimulates E2F1/DP1 activity. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4139-45.
- Tsai, K.Y., Hu, Y., Macleod, K.F., Crowley, D., Yamasaki, L., und Jacks, T., (1998).** Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Mol. Cell* **2**: 293-304.
- Tsai, K.Y., MacPherson, D., Robinson, D.A., Crowley, D., und Jacks, T. (2002).** ARF is not required for apoptosis in Rb mutant mouse embryos. *Curr. Biol.* **12**: 159-63.
- Van den Hoff, M.J., Moormann, A.F., und Lamers, W.H. (1992).** Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. *Nucleic Acids Res.* **20**: 2902.
- Verona, R., Moberg, K., Estes, S., Starz, M., Vernon, J.P., und Lees, J.A. (1997).** E2F activity is regulated by cell-cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 7268-82.

- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., und Vaux, D.L. (2000).** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**: 43-53.
- Vigo, E., Müller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C., und Helin, K. (1999).** CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 6379-95.
- Vorburger, S.A., Pataer, A., Yoshida, K., Liu, Y., Lu, X., Swisher, S.G., und Hunt, K.K. (2003).** The mitochondrial apoptosis-inducing factor plays a role in E2F-1-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Ann. Surg. Oncol.* **10**: 314-22.
- Wang, J.Y. (1997).** Retinoblastoma protein in growth suppression and death protection. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**: 39-45.
- Wang, Z.M., Yang, H., und Livingston, D.M. (1998).** Endogenous E2F-1 promotes timely G0 exit of resting mouse embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 15583-86.
- Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., und Bar-Sagi, D. (1999).** Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell. Biol.* **1**: 20-26.
- Weinberg, R.A. (1995).** The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**: 323-30.
- Weinmann, A.S., Bartley, S.M., Zhang, T., Zhang, M.O., und Farnham, P.J. (2001).** Use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F promoter target promoters. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 6820-32.
- Wright, S.C., Zheng, H., und Zhong, J. (1996).** Tumor cell resistance to apoptosis due to a defect in the activation of sphingomyelinase and the 24kDa apoptotic protease (AP24). *FASEB J.* **10**: 325-32.
- Wu, C.-L., Classon, M., Dyson, N., und Harlow, E. (1996).** Expression of dominant-negative mutant DP-1 blocks cell cycle progression in G1. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3698-3706.
- Wu, X. und Levine, A.J. (1994).** p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3602-06.
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F.A., Field, S.J., Greenberg, M.E., Orkin, S., Nevins, J.R., Robinson, M.L., und Leone, G. (2001).** The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **414**: 457-62.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., und Currie, A.R. (1980).** Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306.
- Wyllie, A.H. (1980).** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**: 555-56.

- Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S., and Piwnica-Worms, H. (1994).** Cyclin A / CDK2 binds directly to E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 8420-31.
- Xu, G., Livingston, D.M., and Krek, W. (1995).** Multiple members of the E2F transcription factor family are the products of oncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1357-61.
- Yamasaki, L., Bronson, R., Williams, B.O., Dyson, N.J., Harlow, E., and Jacks, T. (1998).** Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends lifespan of Rb^{+/-} mice. *Nat. Genet.* **18**: 360-64.
- Yu, S.-W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2002).** Mediation of poly(ADP-ribose) Polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**: 259-63.
- Zeng, X., Chen, L., Jost, C.A., Maya, R., Keller, D., Wang, X., Kaelin, W.G. Jr., Oren, M., Chen, J., and Lu H. (1999).** MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 3257-66.
- Zhang X., Chen L., Jost C.A., Zhang, H., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A.A., Ma, D., Luo, R.X., Harbour, J.W., and Dean, D.C. (2000).** Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101**: 78-89.
- Ziebold, U., Reza, T., Caron, A., and Lees, J.A. (2001).** E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos. *Genes Dev.* **15**: 386-91.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999).** An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**: 11549-56.

Vollständige Tabelle (in alphabetischer Reihenfolge) der 470 durch E2F1 positiv regulierten Gensequenzen der Mikroarrayanalyse:

Symbol	Gene Bank Accession #	Unigene Cluster	Signalintensität*	Beschreibung
1D12A	L17325	278	4.97	pre-T/NK cell associated protein
ABT1	A1468953	109428	2.79	TATA-binding protein-binding protein
ACAP1	NM_014716	108947	3.42	KIAA0050 gene product
ACCN2	U78180	274361	2.48	amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal
ADAM15	U41767	92208	4.82	a disintegrin and metalloproteinase domain 15 (metargidin)
ADRB3	A1276134	2549	2.54	adrenergic, beta-3-, receptor
AHSG	AV649810	75430	2.90	alpha-2-HS-glycoprotein
ALDH4A1	NM_003748	77448	2.42	aldehyde dehydrogenase 4 (glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase; pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase)
ALOX12	AF143883	1200	3.91	arachidonate 12-lipoxygenase
ANGPT1	D13628	2463	2.23	angiopoietin 1
ANXA11	BF207899	75510	2.63	annexin A11
AP1G2	A1243593	8991	2.38	adaptor-related protein complex 1, gamma 2 subunit
AP3B1	U81504	155172	3.05	adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit
AP3B2	AF022152	21022	2.77	adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit
APBB2	U62325	296366	2.72	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2 (Fe65-like)
APT6M8-9	AA854119	18434	4.57	ATPase, H+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) membrane sector associated protein M8-9
AQP7	AW779701	25475	2.45	aquaporin 7
ARHGAP4	X78817	3109	17.78	Rho GTPase activating protein 4
ARHGEF2	AB014551	155120	2.05	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2
ARHGEF9	AB007884	54697	2.29	KIAA0424 protein
ARHGEF12	NM_015313	6582	2.52	KIAA0382 protein; leukemia-associated rho guanine nucleotide exchange factor (GEF)
ART3	A120127	24976	3.28	ADP-ribosyltransferase 3
ATP1A3	AL079439	288721	10.36	ESTs
ATP4B	NM_000705	813	2.07	ATPase, H+/K+ exchanging, beta polypeptide
ATP5F1	A1683107	814634	2.94	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1
AVIL	A1796813	47344	2.59	advillin
B7	NM_006992	155586	2.82	B7 protein
BAD	AW007022	76366	3.54	BCL2-antagonist of cell death
BAK1	A1741331	93213	3.05	BCL2-antagonist/killer 1
BCAT2	BE741534	101408	3.55	branched chain aminotransferase 2, mitochondrial
BID	AA582021	172894	4.65	BH3 interacting domain death agonist
BIRC5	AF077350	1578	3.06	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
BLCAP	A1691053	5300	3.48	bladder cancer associated protein
BLu	A1824983	167380	3.96	BLu protein
BLZF1	AW969737	158205	5.31	basic leucine zipper nuclear factor 1 (JEM-1)
BTN2A2	AL021917	91813	3.08	butyrophilin, subfamily 2, member A2
C7	X86328	78065	3.55	complement component 7
C14ORF4	A1376143	179260	2.36	chromosome 14 open reading frame 4
CACNA1S	A1417964	1294	4.38	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit
CALU	AV689083	7753	2.35	calumenin
CAPG	BE892216	82422	3.67	capping protein (actin filament), gelsolin-like
CAPN6	AU136176	169172	2.17	calpain 6
CBFB	L20298	179881	2.65	core-binding factor, beta subunit
CBX6	BE219796	107374	6.77	chromobox homolog 6
CCND1	M73554	82932	3.20	Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)
CCNE1	BE733577	9700	4.16	Cyclin E1
CCNE2	AF091433	30464	6.39	Cyclin E2
CCS	NM_005125	5002	3.16	copper chaperone for superoxide dismutase
CCT6B	D78333	73072	2.13	chaperonin containing TCP1, subunit 6B (zeta 2)
CD9	M38690	1244	2.50	CD9 antigen (p24)
CD37	AW406508	153053	2.61	CD37 antigen
CD47	A1491762	82685	2.08	CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)
CD83	NM_004233	79197	3.30	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)
CDC2L1	BE268611	183418	2.27	cell division cycle 2-like 1 (PITSLRE proteins)
CDC45L	AF053074	114311	11.55	CDC45 (cell division cycle 45, S.cerevisiae, homolog)-like
CDX1	A1738580	1545	2.65	caudal type homeo box transcription factor 1
CEP2	NM_07186	27910	2.14	centrosomal protein 2
CFL2	BE503345	180141	2.28	cofilin 2 (muscle)
CFAR	NM_003879	195175	8.25	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
CGI1	AF038203	3850	2.89	putative cyclin G1 interacting protein
CHAF1A	NM_005483	79018	2.11	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)
CHC1L	AK023010	27007	3.40	chromosome condensation 1-like
CHES1	U68723	211773	3.02	checkpoint suppressor 1
CHIT1	A1097512	91093	4.20	chitinase 1 (chitotriosidase)
CHUK	AF012890	198998	2.75	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
CLU	M64722	75106	4.23	Clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40, 40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)
COQ7	AF098948	157113	3.60	coenzyme Q, 7 (rat, yeast) homolog
COX6C	A1568937	74649	2.24	cytochrome c oxidase subunit VIc
CPB2	M75106	75572	4.64	carboxypeptidase B2 (plasma)
CPS1	AA676489	50966	2.43	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial
CRADD	A1539866	155566	2.06	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
CRSP2	D79413	21586	2.60	cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 2 (150kD)
CRSP9	BF207788	279902	2.08	cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 9 (33kD)
CRTAP	A1434545	155481	5.45	cartilage associated protein
CYP2C8	M17398	174220	2.45	cytochrome P450, subfamily IIC (mephenytoin 4-hydroxylase), polypeptide 8
DDX24	BE409685	1559869	2.10	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 24
DJ-1	BF126090	10958	4.14	RNA-binding protein regulatory subunit
DKFZP434J046	AL133651	116244	3.02	DKFZP434J046 protein
DKFZP434F091	AA460671	30488	2.50	DKFZP434F091 protein
DKFZP566D133	AW305085	167031	2.83	DKFZP566D133 protein
DNAJC8	A1926054	74711	2.90	splicing factor similar to dnaJ
DNM2	NM_004945	167013	2.73	dynamitin 2
DOC2A	BF311314	57714	2.33	double C2-like domains, alpha
DOCK2	D86964	17211	3.01	dedicator of cyto-kinesis 2
DUSP5	U15932	2128	2.50	dual specificity phosphatase 5
DUSP11	AA227899	14611	3.52	dual specificity phosphatase 11 (RNA/RNP complex 1-interacting)
DVL1	AF060611	74375	2.81	dishevelled 1 (homologous to Drosophila dsh)
DYRK3	Y12735	38018	2.35	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3
E1B-AP5	AK021455	155218	2.43	E1B-55kDa-associated protein 5
EBBP	A1539776	241305	2.42	estrogen-responsive B box protein
EDG6	NM_003775	159543	4.64	Endothelial differentiation, G-protein-coupled receptor 6
EDN1	NM_001955	2271	4.32	endothelin 1
EDR2	BE744393	75878	2.49	early development regulator 2 (homolog of polyhomeotic 2)
EDNRA	S57498	76252	2.07	endothelin receptor type A

EIF2S3	BE252813	211539	3.85	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 (gamma, 52kD)
ENO2	X51956	146580	2.52	enolase 2, (gamma, neuronal)
EPAC	BE392782	8578	3.73	Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cAMP
EPIM	D14582	99865	2.91	epimorphin
ET(B)R-LP-2	NM_004767	132049	4.50	Endothelin type b receptor-like protein 2
ETFA	AI261936	169919	3.31	electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide (glutaric aciduria II)
ETR101	AW272884	737	2.61	immediate early protein
ETV6	AI718342	169081	2.32	ets variant gene 6 (TEL oncogene)
EXTL1	NM_004455	150956	2.57	exostoses (multiple)-like 1
F25965	BE504020	42514	2.67	hypothetical protein F25965
FAAH	NM_001441	326190	2.78	fatty acid amide hydrolase
FABP7	AI655549	26770	2.85	fatty acid binding protein 7, brain
FARSL	D84471	23111	3.03	phenylalanine-tRNA synthetase-like
FAT	X87241	166994	6.53	FAT tumor suppressor (Drosophila) homolog
FBXL7	N68666	76798	4.96	f-box and leucine-rich repeat protein 7
FEN1	BE278623	4756	3.07	flap structure-specific endonuclease 1
FGF2	NM_002006	56066	3.99	Fibroblast growth factor 2 (basic)
FGFR3	AI378807	1420	4.63	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)
FHL2	U29332	8302	2.13	four and a half LIM domains 2
FLJ11149	AF038172	37558	2.38	hypothetical protein FLJ11149
FLJ11175	AL360258	33368	3.55	Hypothetical protein FLJ11175
FLJ12949	AK025907	184519	3.20	Homo sapiens cDNA FLJ12949 fis, clone NT2RP2005336, weakly similar to TRICHOHYALIN
FLJ10486	AA884787	173946	2.49	hypothetical protein FLJ10486
FLJ23467	AK027120	16179	2.17	Homo sapiens cDNA: FLJ23467 fis, clone HSI11213
FMNL	NM_005892	100217	2.98	chromosome 17 open reading frame 1B
FOX1	L13203	87236	2.39	forkhead box 1
FPGT	AF017445	150926	2.26	fucose-1-phosphate guanylyltransferase
G5B	R69648	73527	2.78	G5b protein
GA	AF038170	3779	2.28	breast cell glutaminase
GAA	X55079	1437	3.45	glucosidase, alpha; acid (Pompe disease, glycogen storage disease type II)
GABRA2	AW043891	91343	3.11	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 2
GAD2	X69936	170808	3.00	glutamate decarboxylase 2 (pancreatic islets and brain, 65kD)
GALT	NM_000155	75641	2.88	galactose-1-phosphate uridylyltransferase
GARS	AC004976	75280	2.56	glycyl-tRNA synthetase
GATA1	X17254	765	2.07	GATA-binding protein 1 (globin transcription factor 1)
GATA4	NM_002052	243987	4.65	GATA-binding protein 4
GBP2	NM_004120	171862	4.48	guanylate binding protein 2, interferon-inducible
GNAI3	NM_006496	73799	2.06	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3
GNB2	AI424097	91299	3.28	PERQ amino acid rich, with GYF domain 1
GNL1	BE798151	83147	2.79	guanine nucleotide binding protein-like 1
GPX1	BF237880	76686	2.21	glutathione peroxidase 1
GPX2	BE795731	2704	2.46	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
GTF2A2	BF035307	76362	2.69	general transcription factor IIA, 2 (12kD subunit)
H2BFB	AI183311	180779	3.03	H2B histone family, member B
HADHB	NM_000183	146812	3.06	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit
HASJ4442	BE621527	155020	2.23	putative methyltransferase
HBP17	NM_005130	1690	2.88	heparin-binding growth factor binding protein
HDAC2	AU132519	3352	2.47	histone deacetylase 2
HEP27	NM_005794	272499	2.97	short-chain alcohol dehydrogenase family member
HESX1	BF001626	171980	2.64	homeo box (expressed in ES cells) 1
HIRIP5	AI818645	17368	2.15	HIRIP5 protein
HKR3	NM_005341	2364	2.05	GLI-Kruppel family member HKR3
HLA-DMA	AI494316	77522	5.26	major histocompatibility complex, class II, DM alpha
HNF4A	AL132772	54424	2.61	hepatocyte nuclear factor 4, alpha
HNRPAB	AI277400	81361	4.13	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
HOXD4	X17360	278255	3.22	homeo box D4
HSPA1L	AI955159	80288	2.91	heat shock 70kD protein-like 1
HSPA9B	BE273464	3069	2.84	heat shock 70kD protein 9B (mortalin-2)
HSPA6	X51757	3268	2.42	heat shock 70kD protein 6 (HSP70B')
HSU79252	NM_013298	240062	2.79	hypothetical protein
I-1	AL117432	26285	2.05	imidazoline receptor candidate
IDH1	AA913772	11223	2.85	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
IDI1	X17025	76038	2.02	isopentenyl-diphosphate delta isomerase
IFNA2	V00549	211575	7.80	Interferon, alpha 2
IL11	AI128942	1721	4.20	Interleukin 11
IL1B	X56087	126256	2.40	interleukin 1, beta
IL1RL1	D12763	66	2.50	Interleukin 1 receptor-like 1
ILF2	BE614422	75117	3.97	Interleukin enhancer binding factor 2, 45kD
ING1	AF181849	46700	5.27	inhibitor of growth 1 family, member 1
IRS1	NM_005544	96063	4.26	insulin receptor substrate 1
ISG15	AI739106	833	2.46	Interferon-stimulated protein, 15 kDa
ISL1	U07559	505	4.83	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain, (islet-1)
KAL1	AA419498	89591	4.51	Kallmann syndrome 1 sequence
KDELRL1	BE387670	78040	3.36	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1
KHK	NM_006488	81454	3.46	ketohexokinase (fructokinase)
KIAA0052	D29641	278608	2.10	KIAA0052 protein
KIAA0143	AI040768	84087	2.20	KIAA0143 protein
KIAA0185	AA732399	239499	2.22	KIAA0185 protein
KIAA0189	D80011	95140	4.47	KIAA0189 gene product
KIAA0200	AF221759	76986	3.39	KIAA0200 gene product
KIAA0205	NM_014873	3610	2.39	KIAA0205 gene product
KIAA0211	AI500407	79347	2.73	KIAA0211 gene product
KIAA0261	AW402845	154978	5.20	KIAA0261 protein
KIAA0320	AB002318	150443	3.83	KIAA0320 protein
KIAA0337	NM_014786	45180	2.02	KIAA0337 gene product
KIAA0363	AB002361	96633	4.37	KIAA0363 protein
KIAA0375	AW966544	26951	4.57	KIAA0375 gene product
KIAA0455	AB007924	13245	12.96	KIAA0455 gene product
KIAA0500	AW444959	118164	2.03	KIAA0500 protein
KIAA0528	BE220324	30656	3.10	KIAA0528 gene product
KIAA0546	AB011118	26764	4.36	KIAA0546 protein
KIAA0556	AB011128	30512	2.05	KIAA0556 protein
KIAA0596	AB011168	259729	4.06	KIAA0596 protein
KIAA0623	AI564164	151406	2.95	KIAA0623 gene product
KIAA0663	W68201	17969	5.19	KIAA0663 gene product
KIAA0677	NM_014663	155983	2.65	KIAA0677 gene product
KIAA0678	AA931842	12707	2.44	KIAA0678 protein
KIAA0701	AI797037	153293	2.04	KIAA0701 protein
KIAA0710	BE177695	273397	2.68	KIAA0710 gene product
KIAA0767	AL096766	95180	12.88	KIAA0767 protein
KIAA0775	NM_014726	94790	6.41	KIAA0775 gene product

KIAA0790	AB018333	12002	3.07	KIAA0790 protein
KIAA0792	AK022505	119387	2.67	KIAA0792 gene product
KIAA0808	AB018351	184297	2.73	KIAA0808 gene product
KIAA0855	AA868772	182982	2.69	golgin-67
KIAA0893	R58914	3830	2.59	KIAA0893 protein
KIAA0903	BE327553	16218	9.41	KIAA0903 protein
KIAA1046	AA429863	89519	2.61	KIAA1046 protein
KIAA1140	AB032966	131728	2.59	KIAA1140 protein
KIAA1535	AA569959	284171	2.48	KIAA1535 protein
KIF5A	AL118561	192760	4.24	kinesin family member 5A
KLRC1	AF023840	74082	2.10	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1
KTN1	Z22551	211577	2.24	kinectin 1 (kinesin receptor)
LAMB3	AL023754	75517	3.06	laminin, beta 3 (nicein (125kD), kalinin (140kD), BM600 (125kD))
LDB1	AI052361	26002	2.26	LIM domain binding 1
LHB	AV751658	154704	2.24	luteinizing hormone beta polypeptide
LIG3	NM_013975	100299	2.92	ligase III, DNA, ATP-dependent
LOC51093	AI363110	5056	2.19	CGI-41 protein
LOC51109	BE047315	179817	4.14	CGI-82 protein
LOC54550	AI244349	140950	2.28	hypothetical protein
LOC55884	BF110766	136644	5.07	CS box-containing WD protein
LOC56148	AI686747	31809	2.40	hypothetical protein
LSM5	AK024217	227280	3.49	U6 snRNA-associated Sm-like protein
LUC7A	AB034205	3688	7.63	Cisplatin resistance-associated overexpressed protein
LYPLA1	AI889004	12540	4.36	lysophospholipase I
MACMARCKS	BE263830	75061	3.10	MARCKS-like protein
MADD	U44953	82548	2.61	MAP-kinase activating death domain
MAP3K5	NM_005923	151988	3.88	Mitogen-activated protein kinase kinase 5
MAP3K14	Y10256	47007	5.15	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
MAPK12	AI862304	55039	6.78	Mitogen-activated protein kinase 12
MAPK14	Z95152	79107	3.66	Mitogen-activated protein kinase 14
MAST205	AL040961	101474	2.44	KIAA0807 protein
MATN1	NM_002379	150366	3.03	matrilin 1, cartilage matrix protein
MDS019	AF182420	250619	3.54	phorbol-like protein MDS019
MEN1	Y12338	24297	6.47	multiple endocrine neoplasia I
MGB2	AF071219	97644	3.39	mammaglobin 2
MGC15875	AI436552	288673	6.21	Homo sapiens cDNA FLJ13408 fis, clone PLACE1001672, weakly similar to PROBABLE AMINOTRANSFERASE T01B11.2 (EC 2.6.1.-)
MGC2683	BE741777	151032	4.17	Homo sapiens clone 23856 unknown mRNA, partial cds
MGC3200	AW026368	9088	3.74	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761F202 (from clone DKFZp761F202)
MGC4643	NM_003939	226434	2.64	beta-transducin repeat containing
MGST3	AV705554	111811	6.28	microsomal glutathione S-transferase 3
MIA	NM_006533	279651	3.27	melanoma inhibitory activity
MIG-6	BE857934	11169	2.07	Gene 33/Mig-6
MIPEP	AA524277	68583	2.78	mitochondrial intermediate peptidase
MMP16	NM_005941	90800	17.12	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)
MOC53	AF102544	159410	2.62	molybdopterin synthase sulfurylase
MPO	X15377	1817	5.40	myeloperoxidase
MRS2L	AF288288	30057	2.94	transporter similar to yeast MRS2
MS4A1	M89796	30	2.31	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
NAB2	U48361	159223	2.03	NGFI-A binding protein 2 (ERG1 binding protein 2)
NBL1	NM_005380	76307	3.19	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1
NCF4	NM_000631	196352	2.61	neutrophil cytosolic factor 4 (40kD)
NCOR1	AA936708	144904	2.12	nuclear receptor co-repressor 1
NDUFB6	AV707962	109646	3.35	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6 (17kD, B17)
NOS1	U17327	46752	3.96	nitric oxide synthase 1 (neuronal)
NPFF	BE048069	104555	2.01	neuropeptide FF-amide peptide precursor
NPY1R	M84755	169266	2.77	neuropeptide Y receptor Y1
NUBP1	W05508	81469	2.17	nucleotide binding protein 1 (E.coli MinD like)
NUDEL	AF038203	3850	2.90	Homo sapiens clone 23596 mRNA sequence
ODZ1	AL022718	23796	4.69	odz (odd Oz/ten-m, Drosophila) homolog 1
OSF-2	AW131116	136348	3.62	osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)
OSR1	AB017642	95220	2.11	oxidative-stress responsive 1
OVOL1	AF016045	97905	3.08	ovo (Drosophila) homolog-like 1
P115	N57752	288783	4.44	vesicle docking protein p115
p100	U22055	79093	3.35	EBNA-2 co-actiator (100kD)
P2RY11	AF030335	166168	2.07	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 11
P2Y5	AI379745	189999	3.91	purinergic receptor (family A group 5)
PABPC4	U75686	169900	3.31	poly(A)-binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form)
PACE	X17094	59242	3.19	paired basic amino acid cleaving enzyme (furin, membrane associated receptor protein)
PAWR	AA749295	176090	5.99	PRKC, apoptosis, WT1, regulator
PCBP1	AI457666	2853	2.09	poly(rC)-binding protein 1
PCDH11	AA865592	159156	4.09	Protocadherin 11
PCDH20	AF169693	132892	2.18	Homo sapiens protocadherin 13 (PCDH13) mRNA, partial cds
PCSK7	BE326581	32978	2.78	proprotein convertase subtilisin/kexin type 7
PDE2A	U67733	154437	2.63	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated
PDZ-73/NY-CO-38	AB018687	132945	3.74	PDZ-73 protein
PENK	AI918759	93557	5.25	proenkephalin
PEX11B	AI743597	83023	3.14	peroxisomal biogenesis factor 11B
PIB5PA	AC005005	21492	2.49	phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate 5-phosphatase, A
PIGH	AW629157	177	4.32	Phosphatidylinositol glycan, class H
PIP	Y10179	99949	3.44	prolactin-induced protein
PLOD	BF035753	75093	2.82	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase, Ehlers-Danlos syndrome type VI)
PMM2	AU130288	154695	2.19	phosphomannomutase 2
POLR2G	BE729377	14839	2.47	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G
PP15	X07315	151734	3.69	nuclear transport factor 2 (placental protein 15)
PPARD	AL022721	106415	2.18	peroxisome proliferative activated receptor, delta
PPL	AF013717	74304	2.61	periplakin
PPM1A	S87759	57764	2.19	protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform
PPP1R3	NM_002711	127614	4.24	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3 (glycogen and sarcoplasmic reticulum binding subunit, skeletal muscle)
PPP1R7	NM_002712	36587	8.08	protein phosphatase 1, regulatory subunit 7
PPP2R5B	AV708790	75199	3.78	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), beta isoform
PPT1	NM_000310	3873	2.11	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)
PRDX2	BF696224	146354	2.29	peroxiredoxin 2
PRI	AF09848	194724	3.08	pronapsin A
PRKCABP	AW157330	180871	5.32	protein kinase C, alpha binding protein
PRKAR2B	M31158	77439	2.17	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta
PRMT3	AI986271	152337	4.27	protein arginine N-methyltransferase 3(hnRNP methyltransferase S. cerevisiae)-like 3
PRPS2	NM_002765	2910	2.87	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2
PSMA6	BE881376	74077	6.29	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 6
PSMB7	AA206786	118065	3.31	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7

PSME2	D45248	179774	2.51	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)
PTDSS1	D14694	77329	2.09	phosphatidylserine synthase 1
PTE1	X86032	283476	4.15	peroxisomal acyl-CoA thioesterase
PTER	AI928486	129915	2.67	phosphotriesterase related
PTHRI	NM_000316	1019	3.59	parathyroid hormone receptor 1
PTOV1	BF194780	19555	2.73	prostate tumor over expressed gene 1
PTPNS1	AL034562	156114	2.67	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1
PIX	NM_002857	168670	2.24	peroxisomal farnesylated protein
RAB22A	AI086375	288968	2.20	RAB22A, member RAS oncogene family
RAD51C	AF029669	11393	2.52	RAD51 (S. cerevisiae) homolog C
RAD52	U12134	89571	10.41	RAD52 (S. cerevisiae) homolog
RANBP1	AI278391	24763	2.23	RAN binding protein 1
RARB	AA917936	171495	2.17	retinoic acid receptor, beta
RCE1B	AF121951	288626	3.47	RCE1, prenyl protein protease (yeast homolog B)
REN	AW771390	3210	4.39	renin
RFC3	L07541	115474	14.2	Replication factor C (activator 1) 3 (38kD)
RFNG	BE250669	12862	3.43	radical fringe (Drosophila) homolog
RFP2	NM_005798	151428	3.43	ret finger protein 2
RGS7	U32439	79348	29.50	Regulator of G-protein signalling 7
RGS12	AF030110	78281	2.94	regulator of G-protein signalling 12
RHBDL	AJ272344	137572	4.24	rhomboid (veinlet, Drosophila)-like
RHD	X63094	283822	2.68	Rhesus blood group, D antigen
RNASE6PL	BE881018	8297	3.35	ribonuclease 6 precursor
RP2	AI824459	44766	5.17	retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive)
RPL23A	AA857067	184776	6.14	ribosomal protein L23a
RPS16	AI804915	75227	4.62	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9 (39kD)
RPS28	AI675995	153177	2.05	ribosomal protein S28
RPS6KA1	L07597	149957	4.05	ribosomal protein S6 kinase, 90kD, polypeptide 1
RRN3	AA070750	110103	2.54	RNA polymerase I transcription factor RRN3
RSC1A1	AI302971	239459	2.48	regulatory solute carrier protein, family 1, member 1
RTN1	L10335	99947	9.37	reticulon 1
RXRA	NM_002957	288688	3.56	retinoid X receptor, alpha
RXRB	AL031228	79372	3.59	retinoid X receptor, beta
RY1	AW168122	54649	2.49	putative nucleic acid binding protein RY-1
S100A2	AA593636	38991	2.90	S100 calcium-binding protein A2
S100B	AV701741	93384	3.83	S100 calcium-binding protein, beta (neural)
SAD1	AA758748	12477	2.58	SnRNP assembly defective 1 homolog
SAM68	AA134537	119537	2.10	GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62 (Sam68)
SCNN1G	L36592	3112	2.27	sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma
SCYA13	U46767	11383	2.38	small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 13
SEC24D	NM_014822	19822	3.54	SEC24 (S. cerevisiae) related gene family, member D
SEMA3C	AB000220	171921	2.17	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C
SERPINF2	J02654	159509	9.90	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 2
SF3A1	AU135890	288883	3.49	splicing factor 3a, subunit 1, 120kD
SFRS3	AV764472	167460	2.81	splicing factor, arginine/serine-rich 3
SHMT2	U23143	75069	2.13	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)
SIAT1	X62822	2554	2.13	sialyltransferase 1 (beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase)
SIGLEC6	D86358	117992	4.11	sialic acid binding Ig-like lectin 6
SLC2A2	J03810	167584	2.51	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2
SLC2A4	M20747	95958	2.48	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4
SLC9A1	M96067	170222	2.69	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 1 (antiporter, Na+/H+, amiloride sensitive)
SLC23A2	AF170911	136529	2.02	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2
SLC24A1	AF026132	173092	2.04	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 1
SLC25A16	M31569	180408	4.32	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; Graves disease autoantigen), member 16
SLC6A3	M95167	406	3.11	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3
SMS	BE880227	89718	2.64	spermine synthase
SNAP23	AW206100	184376	2.77	synaptosomal-associated protein, 23kD
SNAP91	AA421284	12477	2.58	KIAA0656 gene product
SNAPC3	AA829743	164915	2.34	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 3, 50kD
SNRPE	X12466	1066	2.36	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E
SOX10	AA424514	44317	3.26	SRY (sex determining region Y)-box 10
SPIB	NM_003121	192861	3.91	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
SPN	J04168	80738	2.62	sialophorin (gpL115, leukosialin, CD43)
SPRR3	AF077374	139322	5.89	small proline-rich protein 3
SPTA1	AA703344	1985	3.06	spectrin, alpha, erythrocytic 1 (elliptocytosis 2)
SRP54	AI022848	49346	6.71	signal recognition particle 54kD
ST5	U15131	79265	2.06	suppression of tumorigenicity 5
STK15	NM_003600	48915	4.50	serine/threonine kinase 15
STXB3	D63506	8813	2.52	syntaxin binding protein 3
SULT1A3	BE745439	274614	2.73	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 3
SUPT5H	AF052165	70186	3.53	suppressor of Ty (S. cerevisiae) 5 homolog
TACTILE	NM_005816	142023	3.15	T cell activation, increased late expression
TADA3L	AI680546	158196	2.42	transcriptional adaptor 3 (ADA3, yeast homolog)-like (PCAF histone acetylase complex)
TARBP1	NM_005646	151518	2.48	TAR (HIV) RNA-binding protein 1
TARBP2	M60801	326	5.58	TAR (HIV) RNA-binding protein
TBCA	AI375387	24930	2.02	tubulin-specific chaperone a
TCEAL1	AW006970	95243	2.40	transcription elongation factor A (SII)-like 1
TEAD3	BE856144	203846	2.38	TEA domain family member 3
TED	NM_015686	87619	2.44	TED protein
TFAP2C	AI990857	61796	3.68	transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer-binding protein 2 gamma)
TGFA	X70340	170009	2.04	transforming growth factor, alpha
TGN51	AW627777	14894	2.41	trans-Golgi network protein (46, 48, 51kD isoforms)
THY1	AI679251	125359	2.35	Thy-1 cell surface antigen
TIMP1	AI342225	5831	5.60	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor)
TM4SF3	AA620385	84072	6.29	transmembrane 4 superfamily member 3
TNFSF9	AI908454	1524	2.85	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
TNFSF11	AF019047	115770	5.98	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
TNK1	AF097738	203420	3.12	tyrosine kinase, non-receptor, 1
TNNT1	AJ011712	73980	2.45	troponin T1, skeletal, slow
TNNT2	L40162	89749	2.44	troponin T2, cardiac
TOM	AF026031	31334	2.06	putative mitochondrial outer membrane protein import receptor
TP53BP2	AI123916	44585	2.24	tumor protein p53-binding protein, 2
TP11	X69723	83848	2.67	triosephosphate isomerase 1
TRA1	AI917911	82689	4.36	tumor rejection antigen (gp96) 1
TRB@	AA311658	303157	4.23	T cell receptor beta locus
TRD@	X73617	2014	2.72	T cell receptor delta locus
TRIP7	AI264646	77558	5.05	Homo sapiens cDNA FLJ11501 fis, clone HEMBA1002100 42

TTC1	NM_003314	7733	4.13	tetratricopeptide repeat domain 1
UBE4A	BF691464	75275	2.51	ubiquitination factor E4A (homologous to yeast UFD2)
UK114	BF126383	18426	2.17	translational inhibitor protein p14.5
UNC119	AF028789	81728	2.70	unc119 (C.elegans) homolog
UNG2	AK026075	3041	2.55	uracil-DNA glycosylase 2
UNG	Y09008	78853	3.44	uracil-DNA glycosylase
UROD	AF104432	78601	2.14	uroporphyrinogen decarboxylase
USP15	AF153604	23168	7.32	ubiquitin specific protease 15
VEGFB	U48801	78781	15.64	Vascular endothelial growth factor B
VLDLR	D16494	73729	2.39	very low density lipoprotein receptor
VPS33B	AW249815	26510	3.20	vacuolar protein sorting 33B (yeast homolog)
WDR3	AF083217	33085	2.03	WD repeat domain 3
ZF5128	NM_014347	60580	4.86	zinc finger protein
ZFP47	AW958059	66774	3.98	Human zinc finger protein zfp47 (zf47) mRNA, partial cds
ZNF220	NM_006766	82210	2.66	zinc finger protein 220
no symbol	AI273534	288150	6.29	EST
no symbol	AL046564	157105	6.87	ESTs
no symbol	N47785	46762	5.03	EST
no symbol	N57752	285564	4.44	ESTs
no symbol	AA311658	2003	4.23	T cell receptor beta locus
no symbol	AA809796	20274	4.02	ESTs
no symbol	AI859208	75621	3.94	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1
no symbol	AA621983	116051	3.82	myeloma overexpressed gene(in a subset of t(11;14) positive multiple myelomas)
no symbol	AW969200	272095	3.78	ESTs
no symbol		1217695 (Clone ID)	3.75	Incute EST
no symbol	AW170591	13967	3.63	ESTs, Highly similar to NAALADase L protein [H.sapiens]
no symbol		1260330 (Clone ID)	3.56	Incute EST
no symbol	AI25065	5064	3.51	ESTs
no symbol	AA425325	98427	3.49	ESTs
no symbol		3242863 (Clone ID)	3.36	Incute EST
no symbol	U79273	239483	3.30	Human clone 23933 mRNA sequence
no symbol	AW36469	288361	3.29	Homo sapiens cDNA: FLJ22696 fis, clone HSI11696
no symbol	AA768213	91139	3.20	ESTs
no symbol	H17304	31474	3.16	ESTs
no symbol	BE827697	190703	3.10	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 1 polypeptide
no symbol	AW592254	112607	3.09	ESTs
no symbol	AA649070	50133	3.09	ESTs
no symbol	W84331	12770	2.98	Homo sapiens cDNA FLJ11717 fis, clone HEMBA1005241
no symbol	AL120562	46472	2.98	ESTs
no symbol	AI093505	37616	2.97	Human D9 splice variant B mRNA, complete cds
no symbol	AI026771	132804	2.92	ESTs
no symbol	AI978761	53631	2.90	ESTs, Weakly similar to plenty-of-prolines-101 [M.musculus]
no symbol	AI139145	60088	2.85	ESTs
no symbol		2040657 (Clone ID)	2.85	Incute EST
no symbol	BE890059	5636	2.71	Homo sapiens clone 23704 mRNA sequence
no symbol	AK024695	22575	2.70	Homo sapiens cDNA: FLJ21042 fis, clone CAE11204
no symbol	AI333482	7367	2.68	Homo sapiens glucocorticoid receptor AF-1 coactivator-1 mRNA, partial cds
no symbol	L38935	83086	2.68	Homo sapiens GT212 mRNA
no symbol	AA534229	91375	2.67	Human clone 23614 mRNA sequence
no symbol	T30778	33020	2.65	Homo sapiens cDNA FLJ20434 fis, clone KAT03803
no symbol	AF067420	283305	2.63	Homo sapiens SNC73 protein (SNC73) mRNA, complete cds
no symbol	AI767324	120589	2.60	ESTs
no symbol	T17161	6921	2.60	ESTs
no symbol	AA824285	144622	2.59	ESTs
no symbol	AK023489	88605	2.58	Homo sapiens cDNA FLJ13427 fis, clone PLACE1002477
no symbol	AK001031	296286	2.57	Homo sapiens cDNA FLJ10169 fis, clone HEMBA1003662, highly similar to TBX2 PROTEIN
no symbol	AA134594	71528	2.56	ESTs
no symbol	BE217926	27865	2.51	Homo sapiens cDNA: FLJ21333 fis, clone COL02535
no symbol	AI279868	94642	2.51	ESTs
no symbol	AA314429	82148	2.48	hypothetical protein
no symbol	U05227	75270	2.47	GTP-binding protein homologous to Saccharomyces cerevisiae SEC4
no symbol	N63279	48752	2.44	ESTs
no symbol	AW467419	75854	2.42	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2
no symbol	BF352534	285196	2.41	hypothetical protein PRO1847
no symbol	N26306	11493	2.40	Homo sapiens cDNA FLJ13536 fis, clone PLACE1006521
no symbol	AA464096	193482	2.39	Homo sapiens cDNA FLJ11903 fis, clone HEMBB1000030
no symbol	AK022805	175681	2.39	Homo sapiens cDNA FLJ12743 fis, clone NT2RP2000678
no symbol	AI742462	43213	2.37	ESTs, Weakly similar to IEFS_HUMAN TRANSFORMATION-SENSITIVE PROTEIN IEF SSP 3521_ [H.sapiens]
no symbol	AA521448	103845	2.31	ESTs, Weakly similar to predicted using Genefinder [C.elegans]
no symbol	AA974117	129078	2.29	ESTs
no symbol	AI041055	169911	2.23	ESTs
no symbol	AV661518	15617	2.21	ESTs, Weakly similar to ALU4_HUMAN ALU SUBFAMILY SB2 SEQUENCE CONTAMINATION WARNING ENTRY_ [H.sapiens]
no symbol	AC002301	184507	2.20	Homo sapiens Chromosome 16 BAC clone CIT987SK-A-328A3
no symbol	AF055029	4988	2.19	Homo sapiens clone 24711 mRNA sequence
no symbol	AK000838	284194	2.06	hypothetical protein FLJ20831
no symbol	BE350024	27160	2.05	ESTs
no symbol	N21212	235883	2.04	ESTs
no symbol	AW071121	30595	2.01	erythroid differentiation and denucleation factor 1
no symbol	AA876616	16979	2.01	ESTs

*Die Signalintensität ergibt sich, in dem die Intensitäten des Arrays mit der aus 8 h behandelten Zellen auf die Intensitäten des Arrays aus unbehandelten Zellen normiert wurde. Es wurden nur solche Gensequenzen in die Tabelle aufgenommen deren Signalintensität mindestens 2fach erhöht war.

Die Sequenz der 578 Aminosäuren von Dip nach Sequenzierungen des Vollängenkonstruktes und Datenbankvergleichen ist hier abgebildet. Die beiden Epitope gegen die die Antikörperspezifität gerichtet ist, sind gekennzeichnet. Das Epitop des Antikörpers # 49 entspricht den Aminosäuren 2-16 und der Antikörper # 50 ist gegen die Aminosäuren 496-511 gerichtet. Nur Antikörper # 49 wurde benutzt.

MLRRLDKIRFRGHKRDDFLDLAESPNASDTECSDEIPLKVPRT
SPRDSEELRDPAGPGTLIMATGVQDFNRTEFDRLNEIKGHLEI
ALLEKHFLQEELRKLREETNAEMLRQELDRERQRRMELEQKV
QEVLKARTEEQMAQQPPKGQAQASNGAERRSQGLSSRLQKW
FYERFGEYVEDFRFQPEENTVETEEPLSARRLTENMRRLKRG
AKPVTNFBVKNLSALSDWYSVYTSIAIAFTVYMNAVWHGWAIP
LFLAILRLSLNYLIARGWRIQWSIVPEVSEPVEPPKEDLTVSE
KFQLVLDVAQKAQNLF GK MADILEKIKNLFMWVQPEITQKLYV
ALWAAFLASCFFPYRLVGLAVGLYAGIKFFLIDFIFKRCPRLRA
KYDTPYIIWRS LPTDPQFKERSSAAVSRRLQTTSSRSYVPSAP
AGLGKEEDAGRFBHSTKKGNFHEIFNL TENERPLAVCENGWRC
CLINRDRKMPTDYIRNGVLYVTENYLCFESSKSGSSKRNKVIK
LVDITDIQKYKVLSVLP GSGMGIAVSTPSTQKPLVFGAMVHRD
EAFETILSQYIKITSAAASGGDS

Ich danke Frau Prof. Dr. Dr. Pützer für die Überlassung des interessanten Themas, für die Verwirklichung eigener experimenteller Ideen in Rahmen des Projekts und die stete sachliche Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Esche danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung der Arbeit am Institut für Molekularbiologie des Universitätsklinikums Essen.

Mein Dank gilt ebenfalls allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, den technischen Assistentinnen Gabi Hessler, Bärbel Pollmeier, Carmen Theseling und Sonja Zimmermann. Weiterhin möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern Miriam Böckmann, Matthias Drosten, Zhengpeng Li, Nikica Mise, Florian Rödicker und Thorsten Stiewe für die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Sehr hilfsbereit waren Klaus Lennartz bei der Durchführung von FACS-Analysen und Peter Babioch bei Immunfluoreszenzaufnahmen, mein Dank gilt auch ihnen.

Weiterhin möchte ich mich bei Silvia Davies und allen Mitarbeitern der AG III des Institutes für Zellbiologie für die zahlreichen Problemlösungen und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Besonders danke ich Dr. Petra Lutter und Jochen Grabert für ihre kritischen Anmerkungen, Hilfestellungen und ihre unerschöpfliche Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung dieses Manuskripts.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau für ihre grenzenlose Unterstützung bedanken.

Publikationen

Stanelle, J., Stiewe, T., Theseling, C.C., Peter, M., und Pützer, B.M. (2002). Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucleic Acids Res.* **30**:1859-1867.

Stiewe, T., **Stanelle, J.**, Theseling, C.C., Pollmeier, B., Beitzinger, M., und Pützer, B.M. (2003). Inactivation of Retinoblastoma (RB) Tumor Suppressor by Oncogenic Isoforms of the p53 Family Member p73. *J. Biol. Chem.* **278**: 14230-14236.

Stanelle, J., Stiewe, T., Rödicker, F., Köhler, K., Theseling, C.C., und Pützer, B.M. (2003). Mechanism of E2F1-induced apoptosis in primary vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* **59**: 512-519.

Stanelle, J. und Pützer, B.M. 2003. The mitochondrial protein Dip (Death inducing protein) alias KIAA0767 mediates E2F1-induced apoptosis independently of p53. Submitted.

Persönliche Daten

Name	Stanelle
Vorname	Jens
Geburtsdatum	26. September 1974
Geburtsort	Oberhausen
Familienstand	verheiratet, keine Kinder
Wohnsitz	Bügelstr. 22 46045 Oberhausen

Werdegang

1981 – 1985	Hegel-Grundschule, Oberhausen
1985 – 1994	Heinrich-Heine-Gymnasium, Oberhausen Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
08/1994 - 10/1995	Zivildienst als Rettungssanitäter beim Arbeiter Samariter Bund (ASB), Oberhausen
10/1995 - 11/1997	Grundstudium der Biochemie, Ruhr-Universität-Bochum Abschluß: Vordiplom
01/1998 - 08/1998	Studium der Biochemie an der Seattle University und University of Washington, Seattle, WA, USA
10/1998 - 09/2000	Hauptstudium der Biochemie, Ruhr-Universität-Bochum Abschluß: Diplom
11/1999 - 09/2000	Diplomarbeit am Zentrum für Tumorforschung und Tumorthherapie des Universitätsklinikums Essen, Institut für Molekularbiologie, Herr Prof. Esche, AG Frau Prof. Dr. Dr. Pützer. Thema „Herstellung einer subtrahierten cDNA – Bank zur Identifizierung E2F – regulierter pro - apoptotischer Gene“
seit 10/2000	Dissertation am Zentrum für Tumorforschung und Tumorthherapie des Universitätsklinikums Essen, Institut für Molekularbiologie, Herr Prof. Esche, AG Frau Prof. Dr. Dr. Pützer

Berufliche Tätigkeiten

1995-2000	Rettungssanitäter beim Arbeiter Samariter Bund (ASB), Oberhausen
10/2000 - 09/2003	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekularbiologie des Universitätsklinikums Essen
seit 10/2003	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Vektorologie und molekulare Gentherapie des Universitätsklinikums Rostock

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Identifizierung und Charakterisierung von KIAA0767/Dip als neuer E2F1-induzierter Faktor mit pro-apoptotischer Funktion“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Jens Stanelle befürworte.

Essen, den 28.11.03

Prof. Dr. Dr. B. Pützer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 28.11.03

Jens Stanelle

Erklärung :

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 8. der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 28.11.03

Jens Stanelle